

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**GIDALARDA BOZULMAYA NEDEN OLAN MAYA TÜRLERİNİN
TANIMLANMASINA YÖNELİK KİT GELİŞTİRİLMESİ**

FDA-2015-5677

Kurum Dışı

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Zülal KESMEN
Gıda Mühendisliği

Ahmet Yetiman
Mine Erdem
Gıda Mühendisliği

Eylül 2016

KAYSERİ

ÖZET

Bu projede gıdalarda bozulmaya neden olan maya türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması amacıyla hızlı ve güvenilir sonuçlar veren bir tanı sisteminin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Projeye konu olan mayalar, tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalar olup günümüzde endüstriyel öneme sahip birçok ürünün ve ekmek, bira veya şarap gibi çeşitli fermente gıdaların üretiminde büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Bununla birlikte birçok maya türü, gıdalarda gelişerek arzu edilmeyen değişikliklere neden olmakta ve sonuçta bu ürünlerin değişik şekillerde bozulmalarına yol açmaktadır. Gıda üretim hattında ve üründe bozulma ya da kalite düşmesine neden olan maya türlerinin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilerek bozulma etkeni türe özgü, koruyucu tedbirlerin alınması, kaliteli bir üretim için zorunlu görülmektedir. Ancak günümüzdeki moleküler biyoloji alanındaki olağanüstü gelişmelere rağmen, mayaların tanımlanmasında hala doğruluğu ve tekrarlanabilirliği genotipik testlere göre oldukça düşük olan fenotipik testlere dayalı, pahalı ve zaman alıcı tanımlama kitleri kullanılmaktadır. Bu nedenle genotipik yöntemlere dayalı hızlı ve güvenilir sonuçlar veren tanımlama kitlerinin geliştirilmesi zorunlu bir hale gelmiştir. Proje kapsamında farklı maya türleri arasında değişkenlik gösteren DNA dizilerine ait yüksek çözünürlüklü erime eğrileri (HRM analizi) ile erime derecelerinin (T_m) analizine dayanan bir tanı sistemi geliştirilmiştir. Çok sayıda hedef DNA bölgesinin eş zamanlı analizini yapabilen bu sistem, “Çoklu Fragment Melting Analiz Sistemi (MFMAS)” olarak isimlendirilmiştir. Türe özgü erime eğrilerinin ve erime derecelerinin analiz edilerek karşılaştırılmasını sağlayan MFMAS sistemi, verilerin depolanması, görselleştirilmesi ve analiz edilmesi amacıyla geliştirilen bir yazılım ile desteklenmiştir. Proje kapsamında ayrıca geliştirilen MFMAS sisteminin, veritabanına kaydedilen tüm maya türlerini, yüksek spesifite ve doğrulukta başarılı bir şekilde tanımlayabildiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak geliştirilen sistemin, gıda üretim zinciri içerisine giren maya türlerinin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlayarak gıdalarda maya kaynaklı bozulmaların veya kalite kayıplarının önlemesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca MFMAS sisteminin, benzer tanı kitlerinin geliştirilmesi için bilimsel bir temel oluşturacağı ve ülkemizin bu konudaki dışa bağımlılığını ortadan kaldıracağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: maya, HRM, T_m, MFMAS, Çoklu Fragment Melting Analiz Sistemi, tanı sistemi

ABSTRACT

In this project, it is intended to improve the kit for identification of spoilage yeasts in foods. Yeasts as mentioned in this research are eukaryotic microorganisms with single-celled and nowadays they play central role in producing a variety of products which have industrial importance and a variety of fermented foods such as bread, beer and wine. However, a lot of yeast species lead undesirable changes in food and ultimately they give rise to spoilage of them in different ways. It is required that accurate and quick detection of yeast species which are caused decomposition or reducing quality of food products and so taking protective measures as species-specific for quality food manufacturing. But, despite extra ordinary development in the field of molecular biology today, it is used identification systems based phenotypic tests having low repeatability are expensive and time-consuming. Therefore, it is imperative that improving the identification system based genotypic methods which yield quick and reliable results and also have low cost. Within the scope of this project, the yeast diagnostic system based on high-resolution melting curves and melting temperature that are obtained from DNA sequences vary between yeasts was developed. The new identification system was named as “Multi Fragment Melting Analysis System” (MFMAS). In this project, a software which allow storing, visualizing and analysing data obtained by the system was be also developped and so it was able to species level identification by using the software. By this way, it will be possible to identification of yeasts by quick and correct method and minimize food spoilage and quality loss in food. Moreover, yeast identification system developed at the end of this project will completely eliminate the dependence on this issue in our country and also will create a scientific basis for similar diagnostic systems. On the other hand diagnostic kit developed by the project will be first and only product in this field and there is not any similar product at present.

Key words: yeast, species, HRM, T_m, MFMAS, Multi fragment melting analysis system, identification system

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ.....	4
2.LİTERATÜR ÖZETİ.....	7
2.1. Gıdalardaki Bozulma Etkeni Mayalar.....	9
2.2 Maya Tanımlama Yöntemleri.....	15
2.2.1 Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Fenotipik Yöntemler	15
2.2.2 Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Genotipik Yöntemler.....	16
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1 Çalışma Kapsamında Kullanılan Maya Suşlarının Temini.....	24
3.1.2 Gıda Örneklerinden Maya Suşlarının İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	26
3.2 HRM ve Tm Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Plate Dizaynı.....	30
3.2.1 Primerlerin Dizaynı.....	30
3.2.2 HRM ve Tm analizi için reaksiyon karışımı ve sıcaklık döngü koşulları.....	31
3.2.2 Plate dizaynı	32
3.3. MFMAS Sistemine ait Bilgisayar Yazılımının Geliştirilmesi	34
3.3.1 Farklı PCR cihazları için platform geliştirme	34
3.3.2 HRM verilerinin elde edilmesi.....	37
3.3.3 Veri Ön işleme.....	38
3.4 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Test denemeleri	42
3.4.1 MFMAS sisteminin API 32 C kiti ile karşılaştırılması.....	42
3.4.2 Validasyon testleri	42
4. BULGULAR.....	43
4.1 Gıda örneklerinden izole edilerek tanımlanan maya suşları	43
4.1.1 Rep-PCR Fingerprint Analizi Sonuçları	43
4.1.2 Dizi Analizi Sonuçları.....	49
4.2 HRM ve Tm Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	52
4.3. MFMAS Sistemine ait Bilgisayar Yazılımının Test Edilmesi	71
4.5 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Test denemeleri	92
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	93
KAYNAKLAR	99

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Gıdalarda yaygın olarak bulunan ve bozulmaya sebep olan maya türleri.....	9
Tablo 2.2. Bozulmaya sebep olan mayaların gıdaların duyu kalitesi üzerindeki etkileri	13
Tablo 2.3. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türleri ve izole edildikleri ürünler.....	17
Tablo 3.1. Birimde mevcut olan maya türleri.....	23
Tablo 3.2. Maya suşlarının izole edildiği gıda örnekleri	24
Tablo 3.3. Uluslararası kültür koleksiyonlarından temin edilen maya türleri.....	25
Tablo 3.4. Rep-PCR döngü şartları	28
Tablo 3.5. Dizi analizinde kullanılan primerlerin baz dizilimi	29
Tablo 3.7. HRM ve Tm analizi için kullanılan universal PCR primer setleri	30
Tablo 3.8. HRM ve Tm analizinde kullanılmak üzere proje kapsamında dizayn edilen primerler	30
Tablo 3.9. Tm/HRM analizi döngü şartları	31
Tablo 4.1. Gıda örneklerinden izole edilerek genotipik yöntemlerle tanımlanan maya izolatları	49
Tablo 4.2. U1-U2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri.....	53
Tablo 4.3. NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri	54
Tablo 4.4. SS1f-SS1r primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri	55
Tablo 4.5. CH12f-CH12r primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri	56
Tablo 4.6. Esr1-Esr2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri	57
Tablo 4.7. Fzg1-Fzg2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri	58
Tablo 4.8. MnF-MnR primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri	59
Tablo 4.9. My3f-My3r primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri	60
Tablo 4.10. Her bir maya türünün 8 farklı DNA bölgesinin HRM analizine ait verilerinin, veritabanında sorgulanması ile elde edilen sonuçlar.....	72
Tablo 4.11 API ID 32 C kitleri ile MFMAS sisteminin karşılaştırma testi sonuçları	93
Tablo 4.12. API ve MFMAS sonuçlarının karşılaştırılması.....	96
Tablo 4.13. Tm Değerlerine Ait Validasyon Testi Sonuçları.....	100

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Maya tanısında kullanılan ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri ve universal primerler	18
Şekil 2.2. Yüksek çözünürlüklü erime HRM) eğrileri ve difference eğrileri fark eğrisi).....	22
Şekil 3.1.MFMAS sisteminde kullanılan plate'in şematik görüntüsü.....	34
Şekil 3.2. RDML dosya yapısı	36
Şekil 3.3. R arayüzü.....	37
Şekil 3.4. Studio Arayüzü	37
Şekil 3.5. RDML dosya yapısı	38
Şekil 3.6. Approx Metodu 0.1 sıcaklık aralıklı kural 2 yöntemi Şekil 9Şekil 3.8Approx Metodu 0.3 sıcaklık aralıklı kural 1 yöntemi.....	39
Şekil 3.7. Approx Metodu 0.1 sıcaklık aralıklı kural 1 yöntemi Şekil 11 Şekil 3.9 Approx Metodu 0.3 sıcaklık aralıklı kural 2 yöntemi.....	39
Şekil 3.10. Spline Metodu 0.1 sıcaklık aralıklı.....	39
Şekil 3.11. Spline Metodu 0.3 sıcaklık aralıklı.....	39
Şekil 3.12. 60-95 sıcaklık aralığında normalize hrm eğrisi.....	40
Şekil 3.14. 75-95 sıcaklık aralığında hrm eğrisi	40
Şekil 3.13. 60-95 sıcaklık aralığındaki hrm eğrisi.....	40
Şekil 3.15. 75-95 sıcaklık aralığında normalize hrm eğrisi.....	40
Şekil 3.16. Farklı platelerden alınan örneklerin görselleştirilmesi.....	41
Şekil 3.17. 3 farklı örneğin sıcaklık-floresans grafiği.....	42
Şekil 1. Maya izolatlarına ait rep – PCR analizi ile elde edilen fingerprintler kullanılarak UPGMA ile metot oluşturulan dendogram.....	48
Şekil 4.2. <i>Candida</i> cinsi izolatların 8 farklı primer seti ile elde edilen HRM eğrileri (A): normalize erime eğrisi, (B):difference plot eğrisi, 1: <i>C. zeylanoides</i> , 2: <i>C. diversa</i> , 3: <i>C. ethanolica</i> , 4: <i>C. glabrata</i> , 5: <i>C. Intermedia</i> , 6: <i>C. membranifaciens</i> , 7: <i>C. sake</i> , 8: <i>C. lusitaniae</i> (<i>Clavispora lusitaniae</i>)	64
Şekil 4.3. <i>Pichia</i> cinsi izolatların 8 farklı primer seti ile elde edilen HRM eğrileri (A): normalize erime eğrisi, (B):difference plot eğrisi, 1: <i>P. fermentans</i> , 2: <i>P. kluyveri</i> 3: <i>P. kudriavzevii</i> , 4: <i>P. membranifaciens</i> , 5: <i>P. manshurica</i>	66
Şekil 4.4. <i>Kazachstania</i> cinsi izolatların 8 farklı primer seti ile elde edilen HRM eğrileri (A): normalize erime eğrisi, (B):difference plot eğrisi, 1: <i>Kaz.exigua</i> , 2: <i>Kaz.naganishii</i> , 3: <i>Kaz.servazzii</i>	68
Şekil 4.5. <i>Kluyveromyces</i> cinsi izolatların NL-LS, CH12f-CH12r, SSf1-SSr1, My3f-My3r primerleri ile elde edilen HRM eğrileri (A) normalize erime eğrisi, (B) difference plot eğrisi, 1: <i>K. lactis</i> , 2: <i>K. marxianus</i>	70
Şekil 4.6. Veritabanına kayıtlı tüm izolatların 8 farklı DNA bölgesine ait Tm değerlerinin birlikte analizi ile elde edilen dendogram.....	89
Şekil 4.7. MFMAS sisteminin HRM analizine ait validasyon testi görüntüleri	100

GİRİŞ

Maya aktivitesinin gıdalardaki etkisi çift yönlü olup, bir taraftan ekmek, bira, şarap ve diğer alkollü içeceklerin üretiminde arzu edilen biyokimyasal dönüşümlere neden olurken, diğer taraftan birçok maya türü, bakterilerin gelişemedikleri ortamlarda (düşük su aktivitesi, yüksek tuz/şeker konsantrasyonu düşük pH) dahi gelişerek arzu edilmeyen değişikliklere neden olmakta ve sonuçta bu ürünlerin değişik şekillerde bozulmalarına yol açmaktadır. Maya kaynaklı bozulmalar gıdayı tüketilemeyecek duruma getirerek ekonomik kayıplara neden olabildiği gibi, patojen bakterilerin gelişmesi için uygun bir ortam oluşturarak gıdaları sağlık yönünden riskli duruma getirebilmektedir (Loureiro ve Querol, 1999; Krcmery ve Barnes, 2002; Evren vd., 2011).

Gıdalara çeşitli şekillerde bulaşan mayaların, lipolitik, proteolitik ve pektolitik aktiviteleri sonucunda gıdanın tat, koku ve tekstürü olumsuz yönde etkilenmekte ve sonuçta tüketilebilme özelliğini kaybetmektedir (Fleet, 2011). Bu nedenle gıda üretim hattında ve üründe, bozulma ya da kalite düşmesine neden olan mayaların, hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi, kaliteli ve ekonomik bir üretim için zorunlu görülmektedir. Gıdalarda bozulmaya neden olan maya türlerinin hızla ve doğru bir şekilde tanımlanması, kontaminasyon kaynakları ve rotalarının, fizyolojik ve ekolojik koşullara bağlı olarak değişen bozucu potansiyellerinin belirlenerek, bozulma etkeni türe özgü koruyucu tedbirlerin alınmasına ve dolayısıyla ürün kalitesinin arttırılmasına katkı sağlayacaktır (Deák, 2008).

Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların tanımlanmalarında kullanılan, morfojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakteristiklere dayalı fenotipik yöntemlerin zaman alıcı olduğu ve zaman zaman yanlış tanımlamalara yol açtığı göz önüne alındığında, maya tanımlamada daha güncel olan DNA'ya dayalı genotipik yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Bu amaçla kullanılan Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı yöntemler, mayaların hem tür hem de suş düzeyinde tanımlanmasını mümkün kılmaktadır (Kachatourians, 2014; Kurtzman, 2015).

Son yıllarda mikroorganizmaların tiplendirilmesi amacıyla, DNA fragmentlerinin yüksek çözünürlüklü erime (High Resolution Melting, HRM) analizi ve erime sıcaklık derecelerinin (T_m) belirlenmesine dayanan yöntemler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Cheng vd. 2006; Ajitkumar vd., 2012; Yetiman ve Kesmen, 2015). Bu teknik, hedef DNA fragmentlerinin

PCR ile amplifikasyonundan sonra sıcaklık artışıyla birlikte çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya ayrılmasındaki davranışının karakterize edilmesi esasına dayanır (Ririe vd., 1997). PCR esnasında DNA'nın denatürasyonu süresince floresan boyaların sinyal şiddetinde meydana gelen değişimler, florometrik cihazlar yardımıyla ölçülerek analiz edilmektedir. Analizin PCR'ın gerçekleştiği tüpte yapılması yani kapalı tüp sistemi olması olası kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Analizler kısa bir sürede gerçekleşmekte, bu sayede birçok tiplendirme yönteminin yerini alabilecek özellikte kolay ve hızlı uygulanabilen bir yöntem olduğu ileri sürülmektedir (Montgomery vd., 2007).

Sonuç olarak gıda mikrobiyolojisi ve endüstrisindeki önemi giderek daha iyi anlaşılan mayaların tanımlanmasına yönelik hızlı ve güvenilir sonuçlar veren yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle proje kapsamında gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tespiti için, son yıllarda potansiyel bir yöntem olarak öne çıkan HRM ve Tm analizine dayalı yeni bir yöntemin geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin optimize edilerek ticari bir kite dönüştürülmesi planlanmıştır.

Böylece tamamlanan proje kapsamında maya türlerinin tanımlanmasına yönelik olarak;

- Fenotipik yöntemle yetersiz tanımlama yapan ticari tanı kitlerine alternatif genotipik yöntemlere dayalı tanımlama yapabilen
- Gıda veya çeşitli ortamlardan izole edilen mayaların hızlı ve doğru bir şekilde identifikasyonunu gerçekleştirebilen
- Analizci hatalarının minimuma indirecek, laboratuvar işlemlerini azaltarak iş gücü kayıplarının önlenmesini sağlayacak, otomasyona uygun, one-step bir deteksiyon sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Dolayısıyla;

- Maya kaynaklı gıda bozulmalarının önlenmesine ve buna bağlı olarak üretim kayıpları ve dolayısıyla ekonomik kayıpların azaltılmasına,
- Yalnızca bozulma etkeni maya türüne yönelik koruyucu işlem ve katkıların kullanımının yaygınlaştırılmasına,
- Üründe gereksiz koruyucu katkı maddelerinin kullanımının azaltılarak daha sağlıklı ve güvenli gıda üretimine,
- Edinilecek bilgi birikimi ve tecrübeye dayalı olarak farklı mikroorganizma gruplarının tanımlanması için bilimsel bir temelin oluşturulmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

Funguslar içerisinde yer alan mayalar, ökaryotik hücre yapısına sahip oval, küresel, silindirik şekillerde ve bakterilere kıyasla daha büyük hücre yapıları olan tek hücreli organizmalardır. Mayaların büyük çoğunluğunda vejetatif üreme, tomurcuklanma şeklinde görölse de bölünerek veya eşeysiz ve eşeyli sporlarla çoğalma tiplerine de rastlanmaktadır. Bazı maya türleri hem eşeyli telemorf) hem de eşeysiz anamorf) üreme özelliği göstermekte bu özelliklerinden dolayı farklı isimler almaktadır. Eşeyli üreme özelliği gösteren mayalar askomisetik ve basidiomisetik olmak üzere iki ana fungal sınıfta, seksüel durumları tam olarak bilinemeyen bazı cins ve türler de deuteromisetik sınıfı içinde gruplandırılmaktadır (Deák, 2008; Çakmakçı vd. 2008; Erkmen ve Bozoğlu 2008).

Mayaların çoğu 20-30°C aralığında optimum gelişme gösterir, çok az türün 40-45 °C üzerinde geliştiği bilinmektedir. Bununla birlikte, *Saccharomyces* ve *Zygosaccharomyces* türlerinin de içinde bulunduğu birçok tür, 2-10 °C aralığında gelişerek soğukta muhafaza edilen gıdaların bozulmasında rol oynamaktadır (Fleet, 1992; Betts vd., 1999. Fleet, 2006; Kurtzman ve James 2006; Martorell vd., 2007). Diğer taraftan başta *Candida*, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türleri olmak üzere bazı maya türleri ise, 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda bile aktivitelerini kaybetmemektedirler (Davenport, 1980; Fleet, 1992). Sıcaklık, büyüme ya da gelişim hızının yanı sıra, etanole tolerans, yüksek tuz ya da şeker varlığında gelişim, çeşitli metabolitlerin üretimi gibi çeşitli fizyolojik ya da biyokimyasal özellikleri de etkilemektedir (Tudor ve Board, 1993; Deák ve Beuchat, 1996; Papouskova ve Sychrova, 2007). *S. cerevisiae* ısıya en dayanıklı maya türlerinden biri olarak kabul edilmekte, askosporlarının ise tomurcuk oluşturan hücrelerden yaklaşık yüz kat daha dayanıklı olduğu bildirilmektedir (Fleet, 2006).

Mayaların düşük su aktivitesine bakterilerden daha dayanıklı olduğu ve çoğu türün 0.90-0.95 aw aralığında, bazı türlerin ise, ürüne bağlı olarak 0.65-0.85 aw aralığında bile gelişim gösterdiği bildirilmektedir (Tokuoka, 1993; van Eck vd., 1993; Lages vd., 1999). Birçok maya türü yüksek tuz ve şeker içerikli gıdaların bozulmasından sorumludurlar. *Debaryomyces hansenii*'nin özellikle tuza karşı oldukça dirençli olduğu, hatta bazı suşlarının %20-24 NaCl varlığında hayatta kalabildiği bildirilmektedir (Butinar vd., 2005; Breuer ve Harms, 2006; Papouskova ve Sychrova, 2007). *S. cerevisiae* için üst limit %10-12 NaCl olmakla birlikte bu oran suş ya da pH gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Benzer gözlemler *Yarrowia*

lipolytica, *Z. bailii* ve *Hanseniaspora uvarum* gibi diğ er maya türleri için de rapor edilmiştir (Betts vd., 1999). Diğ er taraftan sıcaklık, pH, su aktivitesi ve ürüne eklenen kimyasal koruyucular gibi mayaların büyüme ve gelişmesini etkileyen birçok çevresel faktör birbirlerini etkileyerek kombine bir etkide bulunduklarından dolayı her biri için kesin sınırların çizilmesi zordur (Fleet, 1992; De  k ve Beuchat, 1996; De  k, 2006; De  k, 2008).

Glukoz, fruktoz, sukroz ve maltoz gibi şekerler, mayalar tarafından etanol ve karbondioksit e dönüştürülerek gaz oluşumuyla birlikte üründe tatlılığın azalmasına ve belirgin bir şekilde alkol tat ve aromasının oluşumuna sebep olur. Mayalar karbonhidrat katabolizmasının ürünü olarak etanolün yanında, yüksek alkoller, organik asitler, gliserol, esterler, aldehytler, ketonlar ve uçucu sülfür bileşenleri de üretirler. Bu bileşenler her ne kadar düşük konsantrasyonlarda üretilseler de ürünün duysal kalitesini önemli derecede etkileyebilirler (Heard, 1999; Romano, 2003).

Mayalar tarafından üretilen peptidazlar, proteazlar, lipazlar, nükleazlar, esterazlar ve dekarboksilazlar gibi aktif enzimler gıda bileşenleriyle etkileşime girerek hücre parçalanmasına ve buna bağlı olarak da gıdalarda kalitenin düşmesine neden olur (Hernawan ve Fleet, 1995; Zhao ve Fleet, 2005). Proteoliz gıdalarda önemli bir bozulma reaksiyonudur ve amonyaklı, acı tat oluşumuna ve protein kaybına yol açar. Her ne kadar mayaların büyük çoğunluğu hücre dışı proteolitik enzim  retmeseler de bazı *Rhodotorula* ve *Cryptococcus* türleri ve *Y. lipolytica*, *Aureobasidium pullulans* bu enzimi üretme özelliğiyle  ne çıkarlar. Ayrıca bazı *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Debaryomyces* ve *Candida* türlerinin de proteaz ürettikleri bildirilmiştir (Roostita and Fleet, 1996; Charoenchai vd., 1997; Strauss vd., 2001; Buzzini ve Martini, 2002).

Mayalar organik asitleri hem üretme hem de tüketme özelliğine sahiptirler, böylece ürünün asitliğini ve aroma profilini değiştirirler (Radler, 1993). Birçok maya türü organik asidi metabolize ederek asitliğini azalıp, pH'nın yükselmesine neden olduğu için bozucu ve patojen bakterilerin gelişimine yol açabilir. Bu  zellik *D. hansenii* ve *Y. lipolytica* gibi laktik asidi metabolize eden türlerin yaygın olarak bulunduğu fermente süt ürünlerinde sorun oluşurmaktadır (Fleet, 1990; Roostita ve Fleet, 1999).

Mayalar, hidrojen sülfid, kükürt dioksit ve dimetil sülfid gibi bir dizi uçucu sülfür bileşikleri üreterek, ürünün koku ve lezzeti üzerinde olumsuz bir etki oluştururlar (Sweigers vd., 2005).

Çeşitli çalışmalarda, *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *P. membranifaciens*, *Dekkera* spp. ve *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türleri gibi basidiomisetik mayaların belirgin miktarlarda sülfür metabolitleri ürettiği bildirilmektedir (Spiropoulos vd., 2000; Mendes-Ferreira vd., 2002; Buzzini vd., 2005).

2.1. Gıdalardaki Bozulma Etkeni Mayalar

Fermente gıda ve içeceklerde mikrobiyal yükünün yüksek olması ve mikroorganizmaların ürettikleri ürünlerle, son üründe tat ve aroma oluşumuna katkıda bulunmalarından dolayı mikrobiyal bozulma kolaylıkla tanımlanamamaktadır. Hatta etnik ve kültürel farklılıklardan dolayı arzu edilen ya da bozulmaya yol açan mikrobiyal aktiviteleri birbirinden ayırt etmek oldukça güçtür (Fleet, 1992). Gıdalarda bozulmaya neden olan maya türlerinin tam sayısı belli olmasa da sıklıkla belirlenen bozucu maya türleri Tablo 2.1'de listelenmiştir. Pitt ve Hocking (1985) gıdalardan izole ettiği 30 maya cinsine ait 110 tür üzerinde çalışmış ve bunlardan 10-12 tanesinin İyi Üretim Uygulamaları (GMP) standartlarına göre işlenmiş ve paketlenmiş gıdalarda bozulmaya neden olduğunu belirlemiştir. Tudor ve Board (1993) ise 'ikinci-bölüm' mayaları olarak adlandırılan bir grup mayaların listesini oluşturmuştur. Özellikle zorlu stres koşullarına dayanıklı bozulma etkeni mayalardan oluşan bu grup Pitt ve Hocking (1985) tarafından oluşturulan listenin devamı niteliğindedir. Deak ve Beuchat (1996) gıdalarda sıklıkla bulunan 35 cins ve 109 türü, bozucu özelliklerini göz önünde bulundurmadan listelemişlerdir. Stratford vd., (2000) ise, meyve suları ve alkolsüz içeceklerde bulunan en önemli 11 bozucu maya türünü tanımlamıştır.

Bozulma etkeni mayalar, meyve suları, şarap, peynir, meyveler, salatalar, şeker ve et ve süt ürünleri gibi birçok gıdada, koku, tat, renk ve yapısal değişikliğe neden olarak onları tüketilemeyecek duruma getirebilmektedirler (Wojtatowicz vd., 2002; Forsythe, 2004). Mayaların 10.000 kob/ml'ye kadar olan hücre konsantrasyonlarının gıda ürünüde kayda değer bir fark yaratmadığı, bozulmanın tespit edilebilmesi için bu değerin 10^5 - 10^6 kob/ml ve üzeri gibi yüksek sayılarda olması gerektiği belirtilmektedir (Fleet, 2011).

Bazı maya türleri fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılmakla birlikte, ortam koşullarının gelişmeleri için optimum olmasından dolayı aşırı düzeyde gelişerek bozucu faaliyette bulunabilmektedirler. Laktozu fermente edebilmeleri; proteolitik ve lipolitik aktivite göstermeleri; laktik asidi ve sitrik asidi asilimile edebilmeleri; düşük sıcaklıklarda ve yüksek tuz

içerikli ortamlarda gelişebilmeleri süt ürünlerinde sıklıkla rastlanan mayaların ortak özellikleridir (Fleet, 1990). *K. marxianus*, *K. lactis*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica* ve *S. cerevisiae* türleri bu nitelikleri taşıyan ve süt ürünlerinden sıklıkla izole edilen mayalardır. Pastörize sütler ise, mayalarla ancak ikincil bulaşma nedeniyle kontamine olmaktadır (Fleet ve Mian, 1987).

Süt, mayaların gelişebilmesi için iyi bir substrat özelliği taşımaktadır. Özellikle bakteriyel rekabetin olmadığı ortamlarda kolaylıkla yüksek konsantrasyonlara 10^8 - 10^9 kob/g) ulaşabilmektedirler (Roostita ve Fleet, 1996). Asitliğin yükselip bakteriyel gelişimi kısıtlamasından dolayı fermente süt ürünleri mayalar tarafından bozulmaya eğilimli ürünlerdir. Yoğurtlar, genellikle kullanılan sütün ya da üretim ortamındaki ekipmanın düşük sanitasyonundan kaynaklanan maya kontaminasyonu sonucu fermentatif bozulmaya uğrayabilirler. Bozulmuş yoğurtlardan izole edilen mayalar içerisinde bazı *Pichia* ve *Candida* türleri ile *S. cerevisiae* ve *K. marxianus* tespit edilmiştir (Caggia vd. 2001; Vasdinyei ve Deák, 2003).

Tablo 2.1. Gıdalarda yaygın olarak bulunan ve bozulmaya sebep olan maya türleri.

Pitt ve Hocking 1985)	Tudor ve Board 1993)	Deak ve Beuchat 1996)	Stratford vd. 2000)
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>C. dattila</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>B. anomalus</i>
<i>C. krusei</i>	<i>C. globosa</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>B. bruxellensis</i>
<i>C. holmii</i>	<i>C. humicola</i>	<i>P. anomala</i>	<i>B. naardenensis</i>
<i>D.hansenii</i>	<i>C. lactis-condensi</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>H. uvarum</i>
<i>Kl. apiculata</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>S. bayanus</i>
<i>P. membranifaciens</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>S.cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. sake</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>Sch. pombe</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>S.exiguus</i>
<i>Z. bailii</i>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>T. delbrueckii</i>
	<i>C. dattila</i>	<i>Z.bailii</i>	<i>Z. bailii</i>
	<i>C. globosa</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Z. bisporus</i>
	<i>C. humicola</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Z. rouxii</i>
	<i>C. lactis-condensi</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Z. microellipsoides</i>
	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. albidus</i>	
	<i>Cryptococcus spp.</i>	<i>C. tropicalis</i>	
	<i>P. anomala</i>	<i>S. exiguus</i>	
	<i>P. subpelliculosa</i>	<i>P. fermentans</i>	
	<i>K. marxianus</i>	<i>Trichosporon pullulans</i>	
	<i>P. burtonii</i>	<i>Hansenia uvarum</i>	
	<i>P. fermentans</i>	<i>C.zeylanoides</i>	
	<i>Sporobolomyces roseus</i>		
	<i>T. delbrueckii</i>		
	<i>Trichosporon cutaneum</i>		
	<i>Trycosporum pullulans</i>		

Peynirde mayaların lipolitik ve proteolitik aktivitesi sonucu yumuşama ve aroma bozuklukları oluşabilmektedir. Peynir çeşidine bağlı olarak, olgunlaşmanın ilk günlerinde *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. lactis* ve *C. zeylanoides* baskın olarak bulunmakta, 5 günden sonra maya

popülasyonunda gerileme ve buna bağlı olarak da bakteri popülasyonunda artış görülmektedir (Valdés-Stauber vd., 1997; Petersen vd., 2002). Yarı yumuşak ve yumuşak peynirlerde bozulma, kötü tat oluşumu, yumuşama, gaz üretimi, renk değişimi ve ambalajda şişme şeklinde görülmektedir. Bu tür bozulmalardan *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *P. membranifaciens*, *Candida*, *Rhodotorula* ve *Cryptococcus* spp. sıklıkla sorumlu tutulmaktadır (Carreira vd., 1998). Yumuşak, yarı-yumuşak ve cheddar tarzı peynirlerin olgunlaşma aşamasında *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus* ve *S. cerevisiae* türlerinin yüksek popülasyonlara ulaşarak peynirin olgunlaşmasına olumlu etkileri olduğu belirtilmektedir. Birçok peynirde, mayalar olgunlaşma mikrobiyotasının önemli bir bileşeni olarak kabul edilmekte, ancak faydalı ya da bozulma etkisi arasındaki farkın suya bağlı olduğu belirtilmektedir (Romano vd., 1989; Addis vd., 2001).

Mayalar et ve et ürünlerinin bozulmasıyla doğrudan ilişkili değildir. Uzun süreli soğukta depolama sonrası üründe gelişen bozucu mayalar, ürünün yapısını bozarak ya da koruyucu bileşenleri inaktive ederek ortamı bakteriler tarafından bozulmaya elverişli duruma getirirler (Dillon ve Board, 1991; Dillon, 1998). Taze kesilen sığır, kuzu, domuz, kümes hayvanları ve deniz ürünleri etlerinde toplam mikrobiyotanın yaklaşık % 5-10'una karşılık gelen düşük popülasyonlarda bulunan mayalar, etlerin soğukta 5-10°C'de) depolanması esnasında gelişebilirler, ancak bakteriler yüksek protein ve su aktivitesi ve nötral pH ortamında mayalardan daha hızlı çoğaldıkları için bu koşullarda bakterilerle rekabet edemezler (Fleet, 2011). *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* ve *Debaryomyces* türleri taze etlerde sıklıkla izole edilen mayalardır. Uzun süreli soğukta depolanan sığır, kuzu ve kümes hayvanları etlerinden izole edilen maya türleri sıklıkla düşük sıcaklıklarda gelişebilme özelliği olan *Cr. laurentii*, *C. zeylandoides* ve *Y. lipolytica*'dır (Fleet, 2011). Bu maya türlerinin kötü tat ve koku oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı türler dondurulmuş kümes hayvanlarının etlerinden de izole edilebilmiştir (Ismail vd., 2000; Hinton vd., 2002).

Mayalar, meyve ve sebzelerin doğal florasında yaygın olarak bulunurlar ve uygun olmayan saklama koşullarında çoğalarak bozulmaya neden olurlar (Dennis ve Buhagiar, 1980). Meyveler sahip oldukları yüksek su aktivitesi, düşük pH ve yüksek karbonhidrat içeriğinden dolayı mayaların gelişmesi için uygun ortamlar oluştururlar (Deak ve Beuchat, 1996). Meyvelerin doğal mikrobiotalarından *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Debaryomyces* ve *Pichia* cinslerine ait mayalar sıklıkla izole edilirler (Kalia ve Gupta, 2006). Meyve dokusu çeşitli şekillerde hasar uğradığında veya bütünlüğü bozulduğunda ortaya çıkan

şekerli ve asitli doku, mayaların gelişimini teşvik eder ve mayalar hızla gelişerek yüksek sayılara ulaşırlar (Fleet, 2011). Kontamine olan mayalar, yalnızca taze meyvede değil meyve suyu, meyve salatası gibi işlenmiş meyve ürünlerine kadar taşınarak bunların da bozulmasında önemli rol oynayabilmektedir.

Özellikle Akdeniz ülkelerinde önemli bir yeri olan zeytinin fermantasyonu ve işlenmesi sırasında mayaların çift taraflı etkileri bulunmaktadır. Bir yandan üründe laktik asidin parçalanması sonucu kötü tat ve koku oluşumuna, yumuşamaya, CO₂ oluşumuyla ambalajda şişmeye, salamura suyunda bulanıklığa sebep olurken, diğer yandan zeytin üretim prosesinde lipaz, esteraz, β -glukozidaz, katalaz ve ödürücü killer) faktörlerin üretimi gibi çeşitli biyokimyasal aktiviteleriyle arzu edilen değişikliklere yol açmaktadırlar (Arroyo-López vd., 2012). Zeytinde *P. membranifaciens*, *P. anomala*, *C. boidinii*, *D. hansenii*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* gibi baskın türlerin yanı sıra 20 veya daha fazlamayaturüne rastlandığı bildirilmektedir (Marquina vd., 1992; Kotzekidu, 1997;Coton vd., 2006).

Mayalar, her ne kadar fırıncılık ürünlerinin fermantasyonundan sorumlu olsalar da bu ürünlerin bozulmalarında da rol almaktadırlar (Bonjean ve Guillaume, 2003; Legan ve Voysey,1991). Bu ürünlerin pişirilmesiyle un ve hamur kaynaklı mikroorganizmalar inaktive olmakta bozulmalar genellikle pişirme sonrası meydana gelen kontaminasyonlar sonucunda oluşmaktadır (Fleet, 1992) Mayalar, ekmeklerde depolanma sırasında alkolik, meyvemsi ve aseton benzeri istenmeyen tatlar meydana getirebilmekte ve tebeşirimsi, beyaz ya da farklı renkte maya gelişimi gözlenebilmektedir. Bu etkilere sebep olan başlıca maya türlerinin *S. cerevisiae*, *Hyphopichia burtonii* ve *Wickerhamomyces (Pichia) anomalus* olduğu bildirilmiştir (Magan ve Aldred, 2006).

Etanolü tolere edebilmeleri ve düşük pH seviyelerinde gelişim gösterebilmelerinden dolayı mayalar alkollü içeceklerde gelişerek, bozulmalarına sebep olabilmektedirler (Fleet, 1998; Thomas, 1993). Biranın bozulmasından genellikle *Saccharomyces* türleri sorumludur. Bira fermantasyonunda rol alan *S. cerevisiae*'nın yabani suşları birada bulunan dekstrinleri fermente ederek istenmeyen kötü tat oluşumuna neden olmaktadır (Dufour vd., 2003; Jespersen ve Jakopsen, 1996). Mayalar, şarabın fermantasyonunda görev almaları nedeniyle önemlidirler. Şarabın mayalar tarafından bozulması genellikle şişelemeden önceki aşamalarda meydana gelmektedir. Şaraplarda problem oluşturan mayalar; *Z. bailii*, *Brettanomyces bruxellensis* gibi

fermentatif türler ve *P. membranifaciens* gibi oksidatif türlerdir (Curtin vd., 2007; Loueiro ve Malfeito-Ferreira, 2006; Silva vd., 2004).

Lipolitik özellik gösteren *Candida*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* ve *Yarrowia* cinsi bazı türler, zeytinyağı, et ve süt ürünleri gibi yağ içeriği yüksek gıdalarda gelişerek lipitlerin parçalanmasına neden olmaktadır. Lipitlerin enzimatik yıkımı, üründe serbest yağ asitlerinin oluşumuna ve buna bağlı olarak da ransit ve kötü tat oluşumu ve asitliğin artmasına neden olur. *Y. lipolytica*, *Cr. diffluens*, *C. zeylanoides*, *Cr. albidus* ve *Cr. laurentii* başlıca lipolitik etki gösteren türler olarak kabul edilmektedir (Buzzini ve Martini, 2002; Charoenchai vd., 1997; Roostita ve Fleet, 1996; Strauss vd., 2001)

Son yıllarda tüketicilerin minimal işlenmiş ürünlere olan taleplerinin artması mikrobiyal bozulma riskini artıran bir gelişme olmuştur. Bu nedenle gıda endüstrisinde proses kontrol ve kalite güvence sistemlerinin rutin bir uygulaması olarak bozulma ya da kalite düşmesine neden olan mayaların tespit edilmesi ve izlenmesi giderek önem kazanmaktadır (Martorell vd., 2005). Maya türlerinin doğru bir şekilde identifikasyonu, gıda sistemlerindeki fizyolojik ve ekolojik özelliklerine bağlı olarak bozucu potansiyellerinin belirlenmesine katkı sağladığı gibi prosesin teknolojik yönden geliştirilmesine ve ürün kalitesinin arttırılmasına da imkan sağlar (Deák, 2008). Ancak maya türlerinin tanımlanmasına yönelik yöntemlerin geliştirilmesi bakterilere kıyasla daha yavaş bir ilerleme göstermiştir.

Görüldüğü gibi mayalar, özellikle bakterilerin gelişmediği koşullarda gelişerek gıdaların ileri derecede bozulmalarına yol açmakta ve onları tüketilemeyecek duruma getirebilmektedir. Mayaların gıdaların kalite parametreleri üzerinde oluşturduğu değişiklikler Tablo 2.2’de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Bozulmaya sebep olan mayaların gıdaların duyusal kalitesi üzerindeki etkileri (Loueiro ve Querol, 1999)

Gıda ürünü	Bozulma etkisi							
	Yüzeyde gelişme	Renk değişimi	Gaz oluşumu	Bulanıklık	Tortu oluşumu	Film oluşumu	İstenmeyen tat oluşumu	Tekstürel değişimler
Taze sebzeler	+	+					+	+
Salamura sebzeler	+	+	+			+	+	+
Tüketime hazır sebzeler	+		+				+	

Taze meyveler	+	+				+	+
Meyve suları			+	+	+	+	+
Tüketime hazır meyveler	+		+			+	
Mayonez, salata sosları	+		+			+	+
Şarap, bira			+	+	+	+	+
Alkolsüz içecekler			+	+	+		+
Şekerleme, reçel, jöle	+	+	+	+		+	+
Şuruplar, bal, meyve konsantreleri			+	+		+	+
Tereyağı, krema	+						+
Peynirler	+		+				+
Yoğurtlar			+			+	+
Dilimlenmiş ekmek	+	+					+
Çiğ ekmek hamuru	+	+					+
Sosisler, et ürünleri	+	+	+				+

2.2 Maya Tanımlama Yöntemleri

2.2.1 Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Fenotipik Yöntemler

Mayaların taksonomik sınıflandırılması ve tanımlanmasında birçok kriter kullanılmaktadır. Geleneksel tanımlama yöntemleri, çoğunlukla eşeyli ya da eşeysiz üreme morfolojileri başta olmak üzere, hücre duvarının, septumun ve sporların yapısal özelliklerinin incelenmesine dayanmaktadır (Deák, 2008). Tanımlama işlemlerinde standart fizyolojik ve biyokimyasal testler öncelikli olarak kullanılmakta, testlerin seçimi maya cins ve türüne göre değişiklik göstermektedir (Van Dijken vd., 1986; Kreger-van Rij, 1984; Kurtzman ve Fell, 1998). Rutin tanımlama için kullanılan geleneksel testler, karbon kaynaklarının asimilasyonu, farklı azot kaynaklarında gelişebilme, vitamin gereksinimleri, farklı sıcaklık ortamlarında ve yüksek konsantrasyonlu şeker veya tuz ortamında gelişebilme, antibiyotiklere direnç ve üreyi hidroliz edebilmeleri gibi özelliklere dayanmaktadır (Yarrow, 1998).

Geleneksel tanımlama yöntemlerinde, tür seviyesinde güvenilir bir maya tanımlaması yapabilmek için genellikle 60-90 testin uygulanması gerekmektedir (Deák, 2008). Hızlı ve basit tekniklerin geliştirilmesiyle geleneksel tanımlama testlerin hacimleri küçültülmüş ve böylece

fermantasyon ve asimilasyon testleri küçük miktarlarda substrat kullanılarak serolojik mikrotitre plakalarda analiz edilebilir duruma getirilmiştir (Lin ve Fung, 1987; Seiler ve Busse, 1988; Heard ve Fleet, 1990). Bu çalışmalar, ticari kullanıma hazır test kitlerinin gelişmelerini sağlamış ve bu otomatize edilmiş kit ve sistemler için bilgisayar destekli veri tabanları oluşturularak piyasaya sunulmuştur. API 20C, Uni-Yeast Tec, Abbott Quantum II, VitekATB32, Automicrobic ve benzeri ticari sistemler saf izolatın inoküle edilmesine ve 2-3 gün inkübasyona bırakılmasına dayanmaktadır. Bu sistemlerin birçoğu ilave analizlere ihtiyaç duymakta, bu analizler yapılmadığı durumlarda ise düşük doğruluk seviyelerinde 50–80% tanımlama yapmaktadırlar (Land vd., 1991; Stager ve Davies, 1992; Paugham vd., 1999). Ayrıca bütün bu ticari test kitleri, klinik tanı çalışmalarında önemi olan maya türlerini tanımlamak için tasarlanmış olup bu sistemlerin veritabanları klinik öneme sahip 60 ya da daha az maya türünü kapsamaktadır. Gıda ve içeceklerde bulunan mayaların tanımlanmasında ise, bu testler daha düşük başarı sağlamaktadır.

Farklı maya tanımlama sistemlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada, 19 türe ait 52 klinik maya izolatı Vitek, Api ID 32C, Api 20C AUX, Yeast Star, Auxacolor, RapID Yeast Plus ve Api Candida ticari kitleri kullanılarak tanımlanmış ve geleneksel yöntemler referans alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Çalışma sonucunda doğru tespit edilen izolat oranının %59.6 ile %80.8 arasında değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca kitlerin düşük tanımlama oranlarına sahip olduğu ve güvenilirliklerinin de yetersiz olduğu yine aynı çalışma sonuçlarına dayanılarak ifade edilmiştir (Verweij vd., 1999).

2.3 Mayaların Tanımlanmasında Kullanılan Genotipik Yöntemler

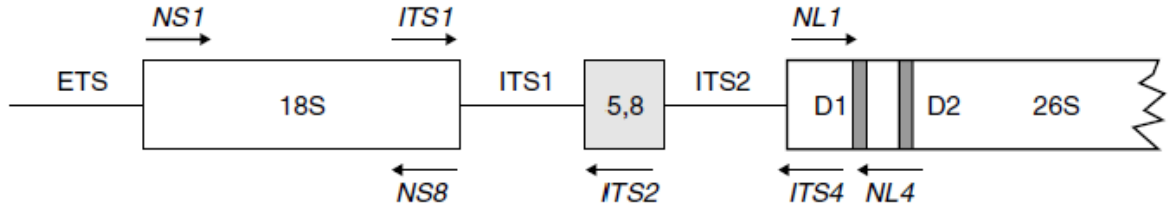
Gıdalarda istenmeyen değişiklikler oluşturan mayaların tanımlanmalarında kullanılan geleneksel yöntemlerin ve ticari kitlerin, zaman alıcı olduğu ve bazen yanlış tanımlamalara yol açtığı göz önüne alındığında, maya tanımlamada daha güncel olan moleküler yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir (Deák, 2008).

PCR'ın keşfi, DNA'ya dayalı yeni tanımlama ve tiplendirme yöntemlerinin de gelişmesine yol açmıştır. Mayaların hem tür, hem de suş düzeyinde tanımlanmasında, özellikle PCR'a dayalı yöntemlerin, daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmesine olanak sağladığı için son yıllarda daha çok tercih edildiği görülmektedir (Deák, 2008).

PCR, belirli bir DNA dizisinin üstel olarak amplifikasyonunu sağlayan bir yöntemdir. PCR tekniğinde, tekrarlanan sıcaklık döngüleri kullanılarak hedef bir DNA dizisinin çok sayıda kopyası, in vitro koşullarda elde edilir (Saiki vd., 1988). Reaksiyon sonucunda ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir. Jele yüklenen DNA'ların molekül büyüklüklerine göre ayrımı sağlandıktan sonra oluşan bantlar ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilir (Aran, 2010).

PCR fingerprint metotları günümüzde en yaygın kullanılan tiplendirme yöntemlerinden biri olmuştur (Deak, 1995; Power, 1996; Mitrakul vd., 1999). Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA RAPD - random amplified polymorphic DNA) analizi, bazı maya türlerinin identifikasyonunda başarılı olarak uygulanan PCR'a dayalı fingerprint yöntemlerinden biridir. Analiz edilecek türlerin DNA dizisi hakkında bir ön bilgiye ihtiyaç duyulmaksızın rastgele dizayn edilmiş yaklaşık 10 bazlık kısa primerler kullanılarak mikroorganizmaların türe spesifik fingerprintlerini elde etmek mümkündür. Uygun reaksiyon koşullarında bu primerler bazı DNA bölgelerini amplifiye ederek farklı boyutlarda fragmentler oluştururlar. Oluşan bu fragmentler elektroforez jelinde farklı hızlarda yürüyerek türe spesifik fingerprintler meydana getirirler (Quesada ve Cenis, 1995; Power, 1996; Andrighetto vd., 2000;).

PCR ribotiplendirme tekniğinde ise türlerin tanımlanmasında en sık kullanılan yöntem PCR ürünlerinin restriksiyon analizidir PCR-RFLP). Çeşitli primerler ile ribozomal RNA genlerinin ya da genler arası bölgelerin ITS, ETS, NTS) tamamı ya da bir kısmı amplifiye edilebilmektedir. Çeşitli restriksiyon enzimlerinin kullanımı ile rDNA'nın değişken veya stabil bölgeleri amplifiye edilerek çeşitli taksonomik seviyelerdeki organizmaların farklılıklarını gözlemlemek mümkün olabilmektedir (White vd., 1990; Deák, 2008). PCR ürünlerinin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde ortaya çıkan türe spesifik uzunluklardaki fragmentlerin tespit edilmesine dayanan PCR-RFLP sayesinde dizi analizi olmaksızın PCR ürünlerinin analizi mümkündür. Bu yöntemin direkt dizi analizi imkanı olmayan araştırmacılar için oldukça avantajlı olduğu bildirilmiştir. Gıdalarda bozulmaya neden olan mayaların PCR-RFLP analizinde genellikle 5.8S-ITS bölgesi kullanılmaktadır. 5.8S rRNA geni, 18S ve 26S rRNA genlerine göre türler arasında daha fazla değişkenlik gösterir (Cai vd., 1996; Esteve-Zarzoso vd., 1999). Esteve-Zarzoso vd., (1999) mayaların 5.8S rRNA geni ve ITS bölgesinin restriksiyon analizi ile tanımlanması için hızlı ve basit bir yöntem geliştirerek, 25 farklı cinse ait 132 maya türünün tanımlanmasına yönelik bir veri tabanı oluşturmuşlardır (Esteve-Zarzoso vd., 1999) (Şekil 2.1).



Şekil 1. Maya tanısında kullanılan ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgeleri ve üniversal primerleri (Deák, 2008).

REP–PCR Repetitive Element Palindromic-PCR) ya da interrepeat PCR ise PCR’a dayalı diğer bir fingerprint yöntemidir. Hedef fragmentlerin tekrar eden DNA dizilerine özel oligonükleotid primerler ile amplifikasyonuna dayanmaktadır. Mayaların tanımlanması ve sınıflandırılması için en çok kullanılan primerler GTC)5, GAC)5, GACA)4, faj M13 DNA’sı ve sadece M13 sekansı GAGGGTGGCGGTTCT)’dır (Loureiro ve Querol, 1999).

Tablo 2.3. Moleküler yöntemlerle tanımlanan maya türleri ve izole edildikleri ürünler

Metot		Maya türleri	Gıda/İçecek	Kaynak
RFLP		<i>S. cerevisiae</i>	Şarap, ekmek, bira	(López vd., 2001)
		<i>S. cerevisiae</i> ve <i>Saccharomyces spp.</i>	Şarap	(Comi vd., 2000)
		<i>K. marxianus</i> , <i>K. lactis</i>	Peynir	(Suzzi vd., 2000)
		<i>C. zeylanoides</i> , <i>D. hansenii</i>	Peynir	(Romano vd., 1996)
PFGE		<i>S. cerevisiae</i>	Mısır hamuru	(Hayford ve Jespersen, 1999.
		<i>S. cerevisiae</i>	Bira	(Tornai-Lehoczki ve Dlačny, 2000)
		<i>Y. lipolytica</i> , <i>C. zeylanoides</i>	Kümes hayvanları	(Deák vd., 2000)
		<i>Brettanomyces</i> , <i>Dekkera</i>	Şarap	(Mitrakul vd., 1999)
RAPD		<i>Hanseniaspora spp.</i>	Meyve suyu, şıra	(Cadez vd., 2002)
		<i>Dekkera spp.</i>	Şarap	(Quesada vd. 1995; Mitrakul vd., 1999)
		<i>S. cerevisiae</i>	Şarap	(Martorell vd., 2005)
		Çeşitli maya türleri	Süt ürünleri	(Andrighetto vd., 2000)
PCR- RFLP	ITS1- 5.8S- ITS2	<i>Non-Saccharomyces</i>	Portakal suyu	(Arias vd., 2002)
		<i>C. humilis</i>	Ekşi hamur	(Gullo vd., 2003)
		<i>S. cerevisiae</i> , <i>Candida</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Pichia</i> ve <i>Trichosporon spp.</i>	Fermente kakao çekirdeği	(Jespersen vd., 2005)
	D1/D2	<i>D. bruxellensis</i> , <i>D. anomala</i>	Şarap	(Cocolin vd., 2004)

	26S	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Şarap, meyve suyu	(Phister vd., 2007)
		<i>D. bruxellensis</i>	Şarap	(Phiste ve Mills, 2003)
Real-time PCR		<i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> ve <i>Zygosaccharomyces spp</i>	Yoğurt, süt, peynir, meyve suyu	(Bleve vd., 2003)
		<i>Z. bailii</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>R. glutinis</i> ve <i>S. cerevisiae</i>	Meyve suyu	(Casey ve Dobson, 2004)

Yukarıda açıklanan genotipik yöntemlerden hiçbirisi direkt tanımlama yapan yöntemler olmayıp birçoğu PCR sonrası uzun ve zahmetli işlemleri gerektirmektedir. Bu aşamada özellikle ethidium bromür gibi toksik ve kanserojenik kimyasalların kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu yöntemler için standardize edilmiş universal bir prosedür bulunmamakta dolayısıyla sonuçlar laboratuardan laboratuara ve analizciden analizciye değişiklik gösterebilmektedir.

PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların thermocycler) hassas deteksiyon sistemleriyle birleştirilmesi ile “real-time PCR” olarak adlandırılan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek son derece az bir kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (Ma vd., 2006). Real-time PCR’da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle klasik PCR tekniğinde ihtiyaç duyulan agaroz jel elektroforezi ve DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR’da reaksiyon boyunca her amplifikasyon döngüsünde oluşan ürün miktarı ile paralel olarak artış gösteren floresans sinyaller her bir örnek için ölçülerek sayısal değerlere çevrilmektedir. PCR ürünlerinin tespitinde kullanılan prensibe bağlı olarak farklı real-time PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresans boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır (Kubista vd., 2006; Dorak, 2006).

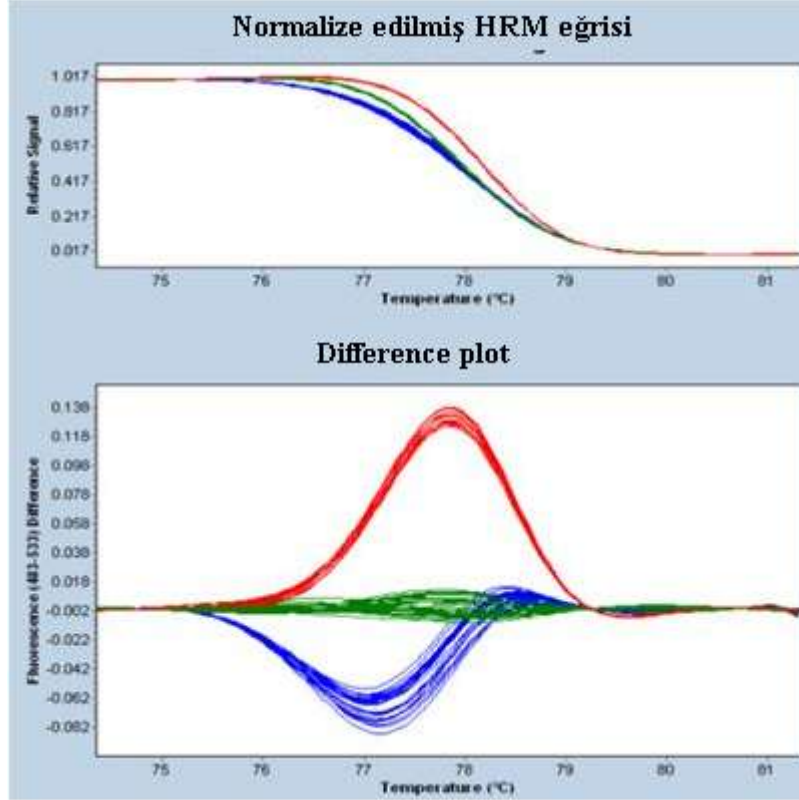
HRM analizi, çift zincirli DNA’nın erime davranışına dayanarak PCR ürünlerinin analizini yapan bir yöntemdir. Real-time PCR reaksiyonlarının devamı niteliğinde olması ve reaksiyonun gerçekleştiği tüp içerisinde analizin yapılabilmesi yani kapalı tüp sistemi olması analizin en önemli avantajlarından biridir (Kuzpınar, 2007; Mustapha ve Singh, 2014).

DNA'nın %50'sinin tek zincirli duruma geldiği sıcaklığa 'erime sıcaklığı' T_m derecesi) adı verilmektedir. T_m derecesi DNA parçasının uzunluğuna ve içerdiği guanin-sitozin (GC) miktarına bağlıdır. Üçlü hidrojen bağı bulunan GC baz çifti, sadece iki hidrojen bağı içeren adenin-timin (AT) baz çiftine göre daha stabildir. Yüksek GC içeriği bulunan DNA dizileri düşük GC baz çifti içeren DNA dizilerine göre daha yüksek T_m derecesine sahiptir (Drumml ve Cichna-Markl, 2014). Farklı DNA fragmentlerinin GC veya AT içeriği farklı olduğu için gözlemlenen erime karakteristiği de farklı olmaktadır (Sümer, 2008). Amplikonun erimesi, son PCR döngüsünden sonra sıcaklığın örneği her 2 sn. de 0.1 °C olacak şekilde) yavaş yavaş arttırılmasıyla gerçekleştirilir. Erime sürecinin sonrasında artan sıcaklığa T) karşı azalan floresan yoğunluğunun F) çizilmesiyle erime eğrisi elde edilir. Ancak her ne kadar PCR şartları optimize edilip aynı miktarlarda kalıp DNA kullanılsa da floresan miktarında farklılıklar meydana gelebilmektedir. Bu farklılıklar, erime öncesi ve sonrası mutlak floresan seviyelerinin hesaplanması ile normalize normalization) edilir. Analiz edilen örneklerin erime eğrilerindeki küçük farklılıkların daha da belirginleştirilmesi amacıyla, referans alınan bir örneğin erime eğrisinden analiz edilen örneğin erime eğrisinin çıkarılmasıyla elde edilen spesifik grafik difference plot) kullanılır (Reed vd., 2007) (Şekil 2.2).

Çift zincirli DNA'nın tek zincire ayrılırken sergilediği floresan şiddetindeki karakteristik değişimi analiz etmemizi sağlayan floresan boyalar HRM analizinde oldukça önemlidir. Bu amaçla kullanılan etidyum bromür, propidyum iyodit gibi boyalar birinci nesil boyalar temsil etmekte, SYBR Green gibi boyalarda ikinci nesil boyalar olarak kabul edilmektedir. Amplikonun doğru bir şekilde analizinin yapılması ürünün boya ile doygunluğuna bağlıdır. Doygunluğun sağlanabilmesi ise yüksek konsantrasyonlarda boya kullanımı ile mümkün olmaktadır. Ancak SYBR Green gibi ikinci nesil boyalar yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında PCR reaksiyonlarını inhibe edebilmektedirler. Bu boyaların düşük konsantrasyonlarda kullanımında ise, DNA zincirinde doygunluk tam olarak sağlanamadığı için denatürasyon sırasında açılan zincirden ayrılan boyalar, DNA'nın denatüre olmayan bölgelerine bağlanmakta, ölçülen floresan şiddetinde azalma beklenirken sinyal sabit kalmaktadır. Yani hatalı ya da düşük hassasiyette ölçüm gerçekleşmektedir (Cosa vd., 2001; White ve Potts, 2006).

Üçüncü nesil boyalar olarak kabul edilen LC Green, Eva Green, SYTO9, ResoLight gibi yüksek doygunluktaki boyaların kullanımıyla PCR ürününün tamamının işaretlenmesi mümkün olmakta, böylece bütün erime bölgeleri tespit edilebilmektedir (Reed vd., 2007). SYBR

Green'in aksine yüksek doygunluktaki boyalar DNA polimerazı inhibe etmedikleri için yüksek konsantrasyonlarda da kullanılabilirler (Vessen vd., 2009).



Şekil 2.2. Yüksek çözünürlüklü erime HRM) eğrileri ve difference eğrileri fark eğrisi)

Son yıllarda yapılan çalışmalar, HRM analizinin klinik araştırmaların yanı sıra gıda analizlerinde de etkili bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Tüketicilerin hileli ürünlere karşı korunması ve haksız rekabetin önlenmesi amacıyla gıdaların üretiminde kullanılan hammadde ve bileşenlerin tespiti ve ürününün etiketinde bulunan bilgilerin kontrolü amacıyla HRM tekniğinin kullanılabileceği gösterilmiştir (Druml ve Cichna-Markl, 2014).

Real-time PCR HRM teknolojisine dayalı genetik mutasyon uygulamaları tıpta yoğun olarak kullanılmasına rağmen bir mikroorganizma tanımlama yöntemi olarak potansiyeli henüz yeni yeni anlaşılmakta bu nedenle konuyla ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, sığır mastitis patojenlerinin tanımlanmasına yönelik olarak mastitise sebep olan 12 patojen bakteri türü ve 14 koagülaz-negatif stafilokok türü real-time PCR-HRM analizine tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda bakteri türlerinin ayrımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve HRM analizinin mastitisli patojenlerin belirlenmesinde hızlı, ucuz, yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip başarılı bir araç olduğu vurgulanmıştır (Ajitkumar vd., 2012).

Kesmen vd., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada sucuktan izole edilen katalaz pozitif kokların gruplandırılması ve identifikasyonu amacıyla real-time PCR HRM analizi kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Sirke ve sirke anasının bakteri profilinin incelendiği bir çalışmada ise, ITS bölgesini hedef alan Tm ve HRM analizi uygulanmış ve sonuçta tanımlanan 14 asetik asit bakteri türden yalnızca ikisinin, Tm sonuçlarının birbirinden farklı olmadığı diğer bütün türlerin türe spesifik Tm değerleri ve HRM eğrileri verdiği tespit edilmiştir (Yetiman ve Kesmen, 2015).

Cheng vd., (2006) klinik önemi olan 25 bakterinin tanımlaması için 16S rRNA gen bölgesini hedef alan real-time PCR HRM analizi gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada tanımlanan bakteri türlerinin büyük çoğunluğunun gıda kaynaklı patojenler olduğu bildirilmiştir (Cheng ve Huang, 2006).

Sonuç olarak gıdalarda bozulmaya neden olan maya türlerinin tespitinde yaygın olarak fenotipik özelliklere dayalı testler kullanılmakta ve düşük doğruluk oranında sonuçlar elde edilebilmektedir. Dolayısıyla gıda mikrobiyolojisi ve endüstrisindeki önemi giderek daha iyi anlaşılan mayaların tanımlanmasına yönelik genotipik yöntemlere dayalı hızlı ve güvenilir sonuçlar veren alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle bu proje kapsamında mikrobiyolojik tanıdaki önemi gün geçtikçe daha iyi anlaşılan HRM analizine dayalı bir yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemin ticari bir tanımlama kitine dönüştürülmesi amaçlanmıştır.

3 MATERYAL VE YÖNTEM

Proje kapsamında geliştirilen maya tanımlama sistemi, HRM ve T_m analizi için kullanıma hazır bir plate ve bunu destekleyen bir bilgisayar yazılımından oluşmaktadır. Tanımlama sisteminin esası; sıcaklık artışı ile birlikte çift zincirli DNA'nın ayrışma karakteristiklerini analiz eden erime eğrisi (Melting curve analysis) analizine dayanmaktadır. HRM analiziyle bu erime eğrisinin sıcaklığa bağlı olarak floresan şiddetindeki değişim grafiği oluşturulmaktadır. Ayrıca çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale geçtiği sıcaklık derecesi olarak bilinen erime noktası (Melting temperature-T_m) analizine dayanmaktadır.

Geliştirilen sistem mikroorganizmalar arasında değişkenlik gösteren birden çok hedef DNA bölgesinin, PCR gibi bir amplifikasyon işlemiyle çoğaltıldıktan sonra eşzamanlı olarak HRM ve T_m analizini yapmaktadır. Buna göre tanımlanacak mikroorganizma türlerinin her bir DNA bölgesi için elde edilen ortalama HRM eğrileri ve T_m değerlerini veri tabanının da kayıtlı türlerin verileri ile karşılaştırıp benzerlik oranına göre tanımlama yapmaktadır.

Ayrıca ölçüm sonuçlarını değişen çevre/analiz koşullarına karşı uyumlaştırmak amacıyla, referans bir mikroorganizmanın aynı hedef DNA bölgeleri eş zamanlı olarak analiz edilmekte ve referans mikroorganizmanın ölçüm sonuçları bilinmeyen mikroorganizmaya ait ölçüm verileri ile karşılaştırılarak bir ön işleminden geçirilip düzeltildikten sonra veri tabanındaki bilinen mikroorganizmalara ait kayıtlı verilerle karşılaştırılarak tanımlanmaktadır.

“Çoklu Fragment Erime Analizi Sistemi (Multi Fragment Melting Analysis System, MFMAS)” olarak isimlendirilen bu sistemin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar 3 ana başlık altında toplanmıştır.

1. Tanımlama sisteminin veritabanını oluşturmak için gıda kaynaklı maya suşlarının elde edilmesi
2. Tanımlamada kullanılacak HRM ve T_m analizine dayalı yöntemin geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin bir plate sistemi olarak optimize edilmesi
3. HRM eğrileri ve T_m değerlerinin görselleştirilmesi, depolanması ve analiz edilmesini sağlayan bilgisayar yazılımının geliştirilmesi

3.1 Çalışma Kapsamında Kullanılan Maya Suşlarının Temini

Proje kapsamında geliştirilecek maya tanımlama sisteminin, veri tabanının oluşturulması amacıyla kullanılan maya suşları 3 farklı şekilde temin edilmiştir. Bu amaçla başlangıçta gıdalarda bozulmalara neden olan en yaygın maya cinslerine ait türlerin tanımlanması ve daha sonra kitin kapsamının genişletilmesi planlanmıştır.

a. Birimde mevcut olan maya suşları

Bölümümüzde daha önce yapılan araştırma projeleri kapsamında çeşitli gıdalardan izole edilerek fenotipik ve genotipik (26 sDNA ve ITS bölgesi dizi analizi) yöntemlerle tanımlanmış 222 adet maya izolatu çalışma kapsamına dahil edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Birimde mevcut olan maya türleri

Tür adı	İzolat sayısı	İzole edildiği kaynak
<i>Candida ethonolica</i>	32	Sirke
<i>Pichia fluxuum</i>	10	Sirke
<i>Dekkera anomala</i>	27	Sirke
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1	Sirke
<i>Pichia membranifaciens</i>	10	Sirke, Turşu
<i>Pichia kudriavzevii</i>	14	Turşu
<i>Pichia kluyveri</i>	3	Turşu
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	6	Turşu
<i>Candida aff. sorboxylosa</i>	6	Turşu
<i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i>	9	Turşu
<i>Kazachstania exigua</i>	12	Turşu
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	19	Turşu, Salamura
<i>Pichia fermentans</i>	11	Turşu
<i>Pichia barkeri</i>	4	Turşu
<i>Pichia subpelliculosa</i>	37	Salamura
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	2	Salamura
<i>Debaryomyces hansenii</i>	19	Salamura

b. Gıda örneklerinden izole edilen maya suşları

Doğal yollarla bozulmuş farklı gıda ürünlerinden maya suşları izole edilerek genotipik yöntemlerle tanımlandıktan sonra proje kapsamına dahil edilmiştir. Bu amaçla örneklemede rengi, kokusu ve görünüşü itibari ile mikrobiyal olarak bozulmuş olduğu tahmin edilen ürünlerin seçimine dikkat edilmiştir (Tablo 3.2). Soğuk zincir ile laboratuvara taşınan bu ürünlerden toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı >105 kob/g olan örnekler, çalışmada kullanılmıştır.

Tablo 3.2 Maya suşlarının izole edildiği gıda örnekleri

Numunenin adı	Sayısı	Numunenin adı	Sayısı
Peynir	4	Asma yaprağı	5
Krema	4	Sirke	4
Yoğurt	5	Turşu	10
Taze et	3	Sirke anası	4
Zeytin	4	Salça	2
Gilaboru	2	Çilek	3
Kabak	1	Portakal	1
Domates	1	Dut	2
Çilek	1	Nektarin	1
Kiraz	1	Yenidünya	1
Üzüm	1	Kayısı	1
Vişne	1	Kiraz	1
Toplam	63		

c. Uluslararası kültür koleksiyonlarından temin edilen maya türleri

Proje kapsamında toplam 27 adet gıda kaynaklı suş, ABD Tarım Bakanlığına bağlı Agricultural Research Service (ARS) kültür koleksiyonundan (NRRL) temin edilerek veri tabanının oluşturulmasında kullanılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Uluslararası kültür koleksiyonlarından temin edilen maya türleri

NRRL kodu	Cins	Tür
Y-17086	<i>Candida</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
Y-5713	<i>Candida</i>	<i>Candida diversa</i>
Y-2089	<i>Candida</i>	<i>Candida membranifaciens</i>
Y-17808	<i>Candida</i>	<i>Candida sake</i>
Y-65	<i>Candida</i>	<i>Candida glabrata</i>
Y-607	<i>Candida</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Y-12968	<i>Candida</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Y-12961	<i>Dekkera</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
Y-1380	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Y-1626	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>
Y-17528	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Knaeniaspora guillermonti</i>
Y-8279	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Y-2415	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Y-48589	<i>Metschnikowia</i>	<i>Metschnikowia fructicola</i>
Y-7111	<i>Metschnikowia</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Y-11506	<i>Pichia</i>	<i>Pichia fermentans</i>
Y-17724	<i>Pichia</i>	<i>Pichia kluyveri</i>
Y-7551	<i>Pichia</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>

Y-6776	<i>Pichia</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
Y-2502	<i>Rhodotarula</i>	<i>Rhodotarula glutinie</i>
Y-2510	<i>Rhodotarula</i>	<i>Rhodotarula mucilaginos</i>
Y-66	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y-9	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Y-1094	<i>Yarrowia</i>	<i>Yarrowia lipalytica</i>
Y-229	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Y-27275	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces lentus</i>
Y-7558	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>

3.1.2 Gıda Örneklerinden Maya Suşlarının İzolasyonu ve Saflaştırılması

Gıda örneklerinden 10 g tartılarak 90 mL Maximum Recovery Dilüent (Merck/Almanya) ile süspanse edilmiş ve steril koşullarda parçalanıp, homojenize edildikten (Retsch mm-400 /Almanya) sonra 10^{-1} den 10^{-6} ya kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan mayaların izolasyonu ve sayımı için Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (Merck/Almanya) besiyerine ekim yapılmıştır. Her bir dilüsyondan yayma plak yöntemi ile DRBC agar bulunan petrilere 0.1 mL ekim yapılmıştır ve 25 ± 2 °C’de 3–5 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda DRBC agar üzerinde gelişen ve sayılabilir yoğunlukta koloni içeren petrilere sayım yapılmış ve morfolojik görünüşleri birbirinden farklı koloniler belirlenmiştir. Seçilenatipik kolonilerden DRBC agar içeren petrilere 3 faz çizilerek saflaştırma yapılmıştır. Bu işlem saf koloniler elde edilinceye kadar 2 – 3 defa tekrar edilmiştir. Saflaştırma işlemi sırasında seçilen koloniler kodlanmıştır. Bu kodlamada ilk olarak örnek adının ilk harfi, ikinci olarak örnek kodu, üçüncü olarak dilüsyon numarası ve dördüncü olarak da o dilüsyondan seçilen maya kolonilerinin sayısı verilmiştir. Saflaştırılan maya kolonileri, içerisinde % 20 oranında gliserol içeren Malt Extract Broth tüplerine aktarılarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.2.1 Maya İzolatlarının Genotipik Olarak Tanımlanması

3.1.2.1.1. Saf Maya İzolatlarından DNA İzolasyonu

- 2 mL’lik tüplere DRBC Agar üzerinde gelişen maya kültürlerinden 1–3 öze dolusu maya toplanıp 400 µL Lysis Buffer bulunan tüplere aktarılmıştır.
- Tüpler 5–10 saniye vorteklenmiş ve 95 °C’de 15 dakika ısıtıcı blok (Thermo Cell-HB-202, Bioer /Çin) içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.
- 56 °C’ye soğutulan tüplerin üzerine 20 µL proteinaz K eklenip vortekslenerek (IKA MS 3 Basic/ Almanya) 56 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir.

- İnkübasyondan sonra tüplere 150 µL %10'luk CTAB, 150 µL 5 M'lık NaCl eklenmiş ve 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Oda sıcaklığına gelen tüplere 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenerek 20 dakika çalkalanmıştır.
- 20000xg hızda 15 dakika santrifüj (Hettich 22R Zentrifugen/Almanya) edilen tüplerdeki süpernatant temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerlerine 250 µL CTAB eklenip 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Soğutulan tüplere 500 µL kloroform: izoamilalkol (24:1) ilave edilip 200 rpm'de 15 dakika çalkalanmıştır.
- 20000xg hızda 15 dakika santrifüj yapılmış, üst faz yeni bir tüpe aktarıldıktan ve üzerine 550 µl izopropanol (2-propanol), 20 µL NH₄AC eklendikten sonra -20 °C'de en az 2 saat bekletilmiştir.
- Tüpler 20000xg hızda 20 dakika santrifüjlenip, üst fazın tamamı dökülmüştür. Pelletin üzerine 500 µL %70'lik soğuk etanol eklenip, çalkalayıcıda 10 dakika çalkalanmıştır.
- 20000xg hızda 10 dakika santrifüjlenip, son olarak üst faz dökülmüş ve tüpler oda sıcaklığında 2–3 saat kurumaya bırakılmıştır.
- Kuruyan tüplere 100 µL TE Buffer (10 mm Tris-1mmEDTA) eklenip, 15–30 dakika bekletildikten sonra nanodrop spektrometre (ACT Gene UVS-99/ Amerika) kullanılarak DNA konsantrasyonu ölçülmüştür.

3.1.2.1.2 Çözeltilerin Hazırlanması

%10'luk CTAB-0,7 M NaCl Çözeltisinin Hazırlanışı: 100 mL'lik çözelti için 10 gCTAB (hexadecyltrimethylammoniumbromide) ve 4.09 g NaCl tartılarak 4.09 g NaCl 70 mL suda çözündürülmüştür. Daha sonra %10'luk CTAB eklenerek hacim saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti otoklavda (Hirayama/HV 50 L/ Japonya) 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

% 70'lik Etanolün Hazırlanışı: 200 mL için; 140 mL absolute (saf) alkole 60 mL steril distile su eklenerek -20 °C'de muhafaza edilir.

Lysis Buffer Hazırlanışı; 250 mL için; 50 mM EDTA (Etilen Diamin Tetra AsetikAsit), 150 mM NaCl, 50 mM Tris ve %5 Triton X100 karıştırılarak hacim saf su ile 250 mL'ye

tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

5 M NaCl Hazırlanışı; 150 mL için; 29.22 g NaCl tartılıp suda çözülür ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir.

TE Buffer Çözeltisinin Hazırlanışı; 200 mL TE buffer için; 0.24 g Tris-HCl ve 0.074 g EDTA 150 mL suda çözülüp hacim 200 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 8'e ayarlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

3.1.2.2 Rep-PCR Fingerprint Analizi

Genom üzerinde tekrarlayan dizilerin PCR ile amplifikasyonuna dayanan (rep-PCR) fingerprint yöntemi, yakın ilişkili türlerin veya tür içerisindeki farklı suşların başarılı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır. Çalışma kapsamında tüm izolatların (GTG)₅ rep-PCR yöntemi ile fingerprint analizi yapılmıştır. Bu amaçla 15 µL ticari PCR master mix, 200 ng her bir saf kültürden izole edilen template DNA ve 0.6 µM (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTGGTG GTG-3') primerinden oluşan reaksiyon karışımının toplam hacmi, distile su ile 30 µL'ye tamamlanmıştır. Termal döngü cihazında (Techne, TC-5000, ABD) gerçekleştirilen reaksiyonun döngü şartları Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4 Rep-PCR döngü şartları

İşlem basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	50 s	35
Yapışma	50	1 dk	
Uzama	72	2 dk	
Final uzama	72	6 dk	1

3.1.2.2.1 Rep-PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

0.5 µg/mL etidyum bromür içeren % 1.5'lik agaroz jele, elde edilen PCR ürünleri yüklendikten sonra 1 x TAE tamponunda, 50 V'da 5 saat yürütülmüş ve oluşan bant profilleri görüntülenmiştir (Gel-Doc XR, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif. ABD).

50 X TAE Buffer Hazırlanışı

242 g 2 M Tris base 57,1 mL 1 M asetik asit, 100 mL 0.5 M EDTA ultra saf su ile karıştırılarak hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve pH 8'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilen karışım oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X TAE yürütme tamponunun hazırlanışı

20 mL 50 X TAE tamponuna 980 mL dH₂O ilave edilerek toplam hacim 1000 mL tamamlanmıştır.

3.1.2.3 Dizi Analizi

Rep-PCR reaksiyonlarında elde edilen tüm izolatlar ait fingerprintler Bionumerics 7.5 programı yardımıyla analiz edilerek gruplandırılmış ve her grubu temsil eden bir izolat seçilerek dizi analizi yapılmıştır. Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen maya türlerinin dizi analizi ile tanımlanması amacıyla ITS (internal transcribed spacer) bölgesi ile 26 S rRNA üzerinde bulunan D1/D2 bölgesi hedef alınmıştır. Dizi analizinde kullanılan primerler Tablo 3.5.'de verilmiştir.

Dizi analizi yapılacak hedef bölgenin amplifikasyonu için 25µL ticari PCR master mix, 20µM ileri primer, 20µM geri primer ve 2µL kalıp DNA kullanılarak, reaksiyon hacmi saf su ile 50 µL'ye tamamlanmıştır. PCR döngü şartları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.5 Dizi analizinde kullanılan primerlerin baz dizilimi.

Oligonükleotid	Dizi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu
ITS1 (İleri primer)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600 bç
ITS4 (Geri primer)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
NL1 (İleri primer)	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	665 bç
NL4 (Geri primer)	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	

PCR işlemi sonucu elde edilen ampliconlar sekans analizine tabi tutulmadan önce %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek kontrolleri edildikten sonra dizi analizi için Medsantek (İstanbul) laboratuvarına gönderilmiştir. Sonuçlar BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.6 Dizi analizi için PCR döngü şartları

İşlem basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	40 s	35
Yapışma	55	1 dk	
Uzama	72	2 dk	
Final uzama	72	10 dk	1

3.2 HRM ve Tm Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Plate Dizaynı

3.2.1 Primerlerin Dizaynı

Proje kapsamında geliştirilen maya tanımlama kiti, tanımlanmak istenen her bir mikrobiyal izolata ait 8 farklı DNA bölgesinin, tek bir plate üzerinde eş zamanlı olarak analiz edilmesini sağlamaktadır. Bu amaçla HRM ve Tm analizi için maya türleri arasında en fazla, aynı türün bireyleri arasında ise en az değişkenlik gösteren DNA bölgeleri hedef alınmıştır. Fungal identifikasyonlarda genellikle ITS (internal transcribed spacer) ve 26S rRNA geni kullanılmaktadır. Literatürde maya tanısında kullanılmak üzere dizayn edilmiş ITS ve 26S rRNA D1/D2 bölgelerini hedef alan bazı universal primer setleri mevcut olup bunlardan 2 tanesi proje kapsamında denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Tablo 3.7). Bunların dışında 26S rRNA, 18S rRNA, 5.8S rRNA genleri ve ITS ve IGS (intergenic spacer region) bölgeleri taranarak çok sayıda primer seti dizayn edilmiş, bunlardan en başarılı sonuçları veren 6 primer seti proje kapsamına dahil edilmiştir (Tablo 3.8). Tüm primer setleri eş zamanlı olarak PCR reaksiyona gireceği için, primerlerin erime derecelerinin birbirine oldukça yakın olmasına ve erime dereceleri arasındaki farkın 1-3 °C'yi geçmemesine dikkat edilmiştir. Proje sonucunda geliştirilen mikroorganizma tanımlama sistemi için patent başvurusunda bulunulduğundan primerlerin baz dizilimi sonuç raporunda verilmemiştir.

Tablo 3.7. HRM ve Tm analizi için kullanılan universal PCR primer setleri

Oligonükleotid	Dizi (5'–3')	Amplikon uzunluğu	Kaynak
NL1(İleri primer)	GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	250 bç	Cocolin vd., 2000
LS2(Geri primer)	ATTCCCAAACAACCTCGACTC		
U1 (İleri primer)	GTGAAATTGTTGAAAGGGAA	260 bç	Sandhu vd., 1995
U2(Geri primer)	GACTCCTTGGTCCGTGTT		

Tablo 3.8. HRM ve Tm analizinde kullanılmak üzere proje kapsamında dizayn edilen primerler

Primer No	Primer Kodu	Hedef Gen	Amplikon uzunluğu (bç)
1	MnF-MnR	26S rRNA gen	187
2	EsrF-EsrR	26S rRNA gen	199
3	Fzg1-Fzg2	26S rRNA gen	140
4	My3f-My3r	26S rRNA gen	185
5	SSf1-SSr1	18S rRNA gene	212
6	CH12f-CH12r	Kromozom XII	243

3.2.2 HRM ve Tm analizi için reaksiyon karışımı ve sıcaklık döngü koşulları

HRM ve Tm analizi için hedef alınan DNA bölgelerinin amplifikasyonları toplam 10 µL hacim içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu karışım, 5µL Fast Start Essential DNA Green Master miks (Roche Applied Science, Almanya), 0.05 µL ileri ve 0.05 µL geri primer, 100 ng kalıp DNA ve 4.15 µL dH₂O içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR döngü şartları ve Tm/HRM analizi, Tablo 3.9'daki gibi optimize edilerek LightCycler 96 (Roche Applied Science, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.9 Tm/HRM analizi döngü şartları

İşlem basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	45 s	30
Yapışma	52	30 s	
Uzama	72	45	
Final uzama	72	10 dk	1
Erime Sıcaklığı Analizi			
Yüksek	40	5 dk	1
Çözünürlüklü	60	20 s	1
Erime Analizi	65	20 s	

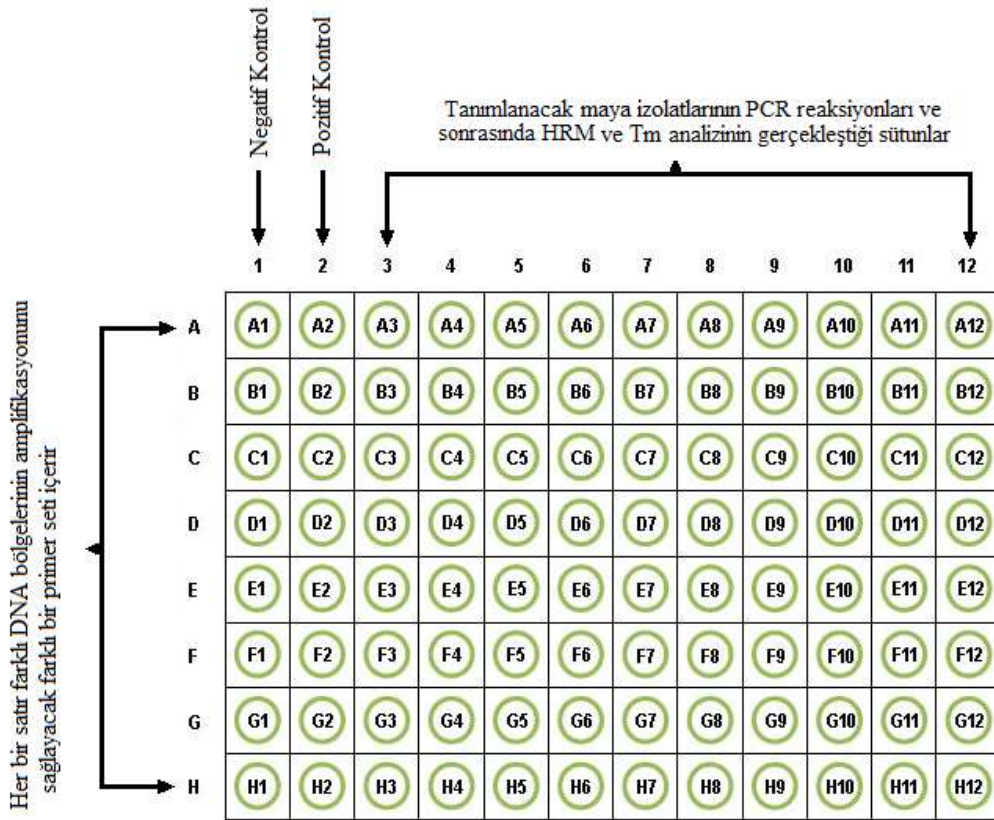
Toplam 30 döngü tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin sıcaklığı 60°C'den 95°C'ye 0.03°C/s hızla artırılırken floresans akümüasyonu ölçülerek erime eğrileri elde edilmiştir. Her bir PCR ürünü için erime sıcaklığı (T_m) değerleri, sıcaklıktaki değişime karşı floresan miktarındaki değişimin birinci dereceden negatif türevi alınarak real-time PCR cihazının yazılımından otomatik olarak hesaplanmıştır. Sıcaklığa karşı elde edilen erime eğrisi dataları yine cihazın yazılımı ile normalize edilerek HRM profilleri oluşturulmuştur. HRM ve T_m analizleri 3 tekerrür olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen T_m değerlerinin Varyans analizi (ANOVA, α=0.05) ile önemliliği sorgulanmış ve örneklerin ortalama T_m değerleri arasında önemli fark olup olmadığı fisher LSD testi ile XLStat 2013 istatistiksel veri analiz programı kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.2 Plate dizaynı

Proje kapsamında geliştirilen maya tanımlama sistemi, herhangi bir maya türünün 8 farklı DNA bölgesine ait HRM eğrileri elde edildikten sonra referans suşun* eğrileri ile karşılaştırarak tanımlama yapacak şekilde dizayn edilmiştir. Maya tanımlama sistemi aynı zamanda analiz edilen hedef DNA dizilerine ait T_m değerlerinin referans suşun* T_m değerleri ile karşılaştırılarak tanımlama yapmaktadır.

Bu amaçla proje kapsamında referans suş (pozitif kontrol) olarak tanımlama sisteminde kullanılan tüm primerlerle reaksiyon veren, türü kesin olarak bilinen, NRRL kültür koleksiyonundan temin edilmiş bir *Saccharomyces cerevisiae* suşu (NRRL Y-66) kullanılmıştır.

Geliştirilen tanımlama sisteminde tanımlanmak istenen her bir izolata ait 8 farklı DNA bölgesi, tek bir plate üzerinde eş zamanlı olarak analiz edilmektedir. Her bir hedef DNA bölgesin ait amplifikasyon ürünleri kullanılarak elde edilen HRM ve T_m verileri ön işlemden geçirilerek kaydedilmiştir. Bilinen mikroorganizma türlerine ait her bir veri, referans suşa ait verilerle kıyaslanarak HRM ve T_m fark verileri elde edilmiş ve veri tabanına kaydedilmiştir. Mikroorganizma tanımlama sisteminin içerdiği yazılım sayesinde, HRM eğrilerinin görselleştirilmesi, analiz edilmesi, karşılaştırılması ve depolanması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. MFMAS sisteminde kullanılan plate'in şematik görüntüsü

3.3. MFMASSisteminde ait Bilgisayar Yazılımının Geliştirilmesi

Sistemin yazılımı, HRM ve T_m verilerinin depolanması, görselleştirilmesi ve analiz edilmesi amacıyla geliştirilmiş bir yazılımdır. Bu yazılım 10 temel adımda tamamlanmıştır.

1. Farklı PCR cihazları için platform bağımsız geliştirme
2. HRM verilerinin elde edilmesi
3. Veri ön İşleme
4. Veri doğruluk kontrolü
5. Verilerin görselleştirilmesi
6. Veritabanının tasarımı
7. Veritabanına kayıt
8. Verilerin karşılaştırılması

3.3.1. Farklı PCR cihazları için platform geliştirme

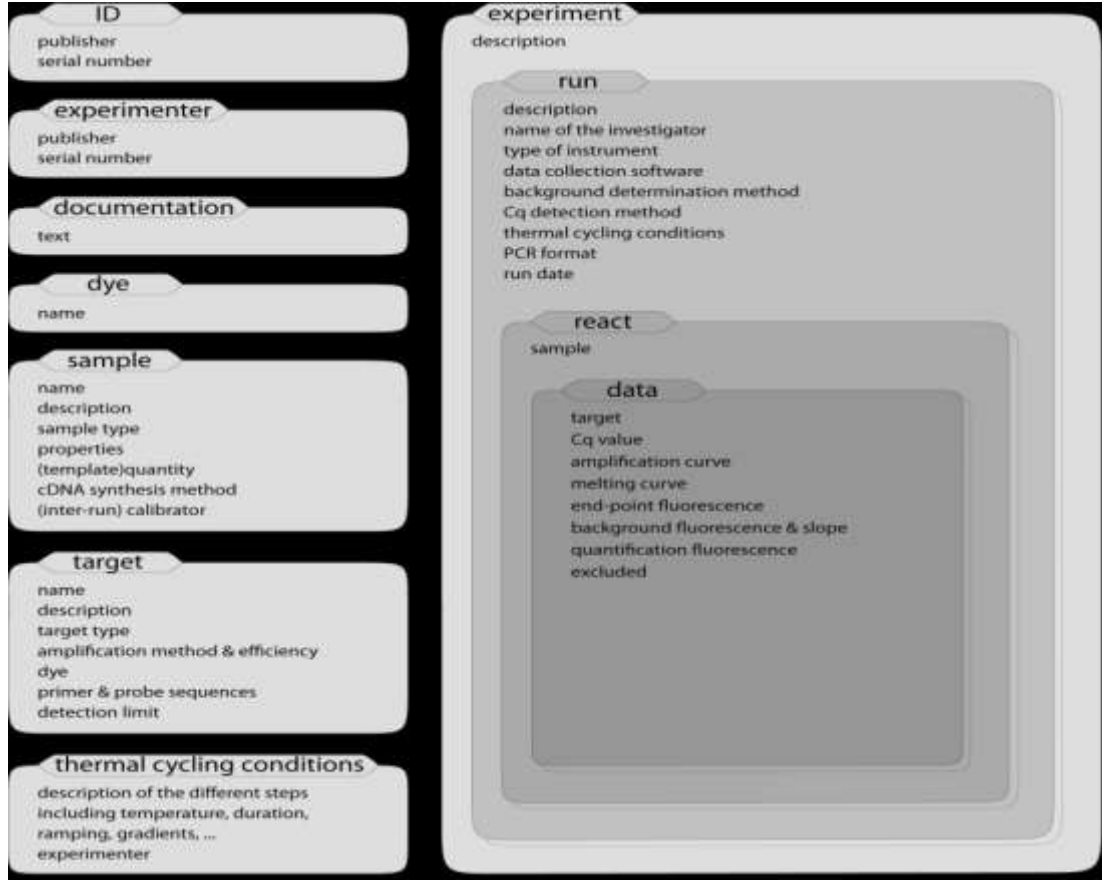
Projede LightCycler 96 isimli Real Time PCR cihazından elde edilen dosyaların analizi yapılmıştır. Bu işlemde R Studio derleyicisi ile RDML(Real Time PCR Markup Language) ve R programlama dili kullanılmıştır. Böylece işletim sistemi ve cihaz fark etmeksizin tüm PCR dosyaları için analiz imkânı sağlanmıştır.

3.3.1.1 RDML(Real Time PCR Markup Language)

RDML, Real Time PCR deney sonuçlarını yorumlamak ve analiz etmek için geliştirilmiş evrensel standarttır. (<http://www.rdml.org/files.php>) Amacı 3.parti yazılımlara gerekli bilgileri sağlayarak farklı laboratuarda farklı kullanıcılar tarafından yapılan deneylerin sonuçlarını paylaşmayı kolay hale getirmek ve verilerin yeniden yorumlanabilmesini sağlamaktır.

Tüm ölçüm verileri hakkında bilgi içermesinin yanı sıra, deney şartları, hesaplama ayarları ile ilgili de bilgi sağlayarak sonuçların yorumlanabilmesi, yeniden analiz yapılabilmesi ve deneysel koşulların anlaşılabilmesi için de yeterli bilgi sağlar.Böylece cihaz yazılımları, veri analiz ve yönetim yazılımları, bilimsel yayınlar ve deneyciler arasında paylaşım imkanı tanır.

Xml tabanlı sıkıştırılmış bir dosya formatına sahiptir. .RDML veya .rdm dosya uzantısı vardır. Hiyerarşik ağaç yapısıyla verileri tutar.

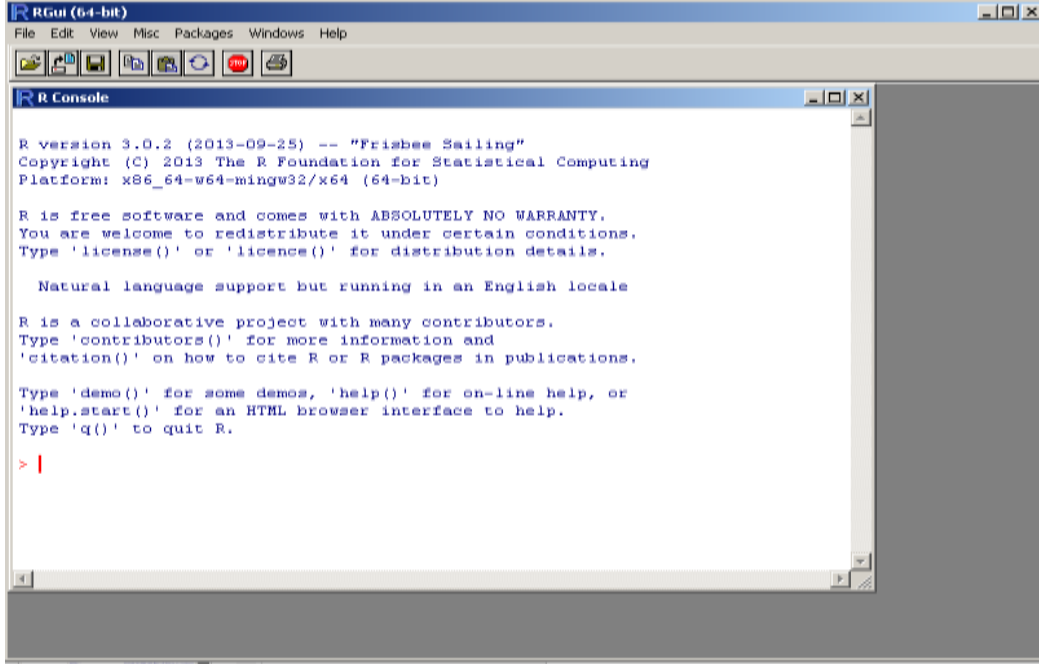


Şekil 3.2 RDML dosya yapısı

3.3.1.2 R Programlama Dili

İlk sürümü 29 Şubat 2016'da yayınlanan, açık kaynak kodlu istatistiksel bir programlama dilidir. Paketler halinde düzenlenmiş fonksiyon yapısıyla düşük bellek kullanımı ve hızlı işlem gücü sağlar. Web sitesi üzerinden yüklenebilen paketlerle güncel, kolay erişimli bir kütüphaneye sahiptir. Yoğun işlemlerin fonksiyon paketleriyle yapılarak işlem yükünün azaltılmasına imkan tanır.

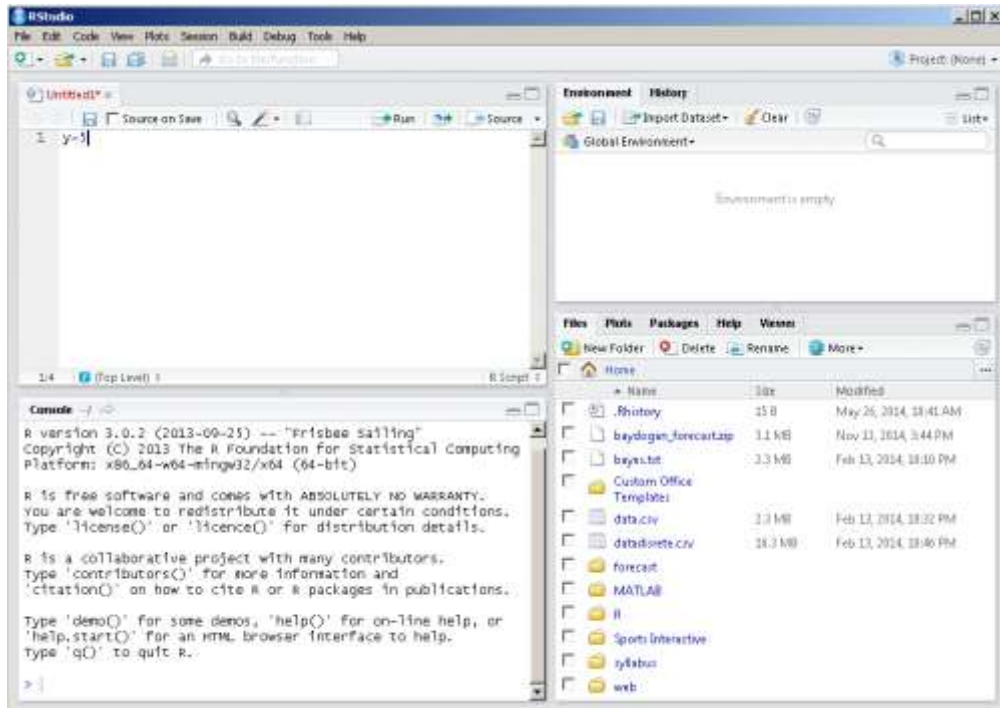
PCR hesaplamaları için RDML standardına uyumlu çok sayıda paket fonksiyon bulundurmaktadır. Böylece uygulamalarda hesaplama zamanı azaltılarak, kullanıcıya hızlı ve doğru sonuçlar sunulabilmektedir.



Şekil 3.3 R arayüzü

3.3.1.3 R Studio

En yaygın kullanılan editör ve arayüz R Studio'dur. R dili dizilim yapısından dolayı kolay hata yapmaya müsaittir. R Studio derleyicisi basit bir arayüz sunarak yazım hatalarını azaltmayı ve kullanım kolaylığı sağlamayı amaçlamaktadır.



Şekil 3.4 StudioArayüzü

3.3.2 HRM verilerinin elde edilmesi

PCR reaksiyonunu takiben gerçekleştirilen erime eğrisi analizinde, PCR ürünlerinin, sıcaklık artışına karşılık floresans şiddetindeki değişim, sayısal verilere dönüştürülmektedir. Proje kapsamında kullanılan LightCycler 96 cihazında elde edilen bu veriler .lc96 uzantılı dosyalarda tutulmaktadır.

R Dili kullanılarak .lc96 uzantılı dosyalar PCR sonuçlarının analiz edilebilmesine imkan sağlayan .rdml dosya standartına dönüştürülmüş ve paket kütüphaneler kullanılarak HRM ve Tm değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.5).

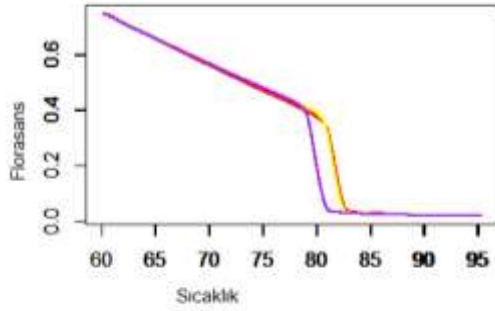
	fdlata.name	exp.id	run.id	react.id	position	sample	target	target.dyeid	sample.type	adp	mdp
A01_M37_unkn_None	A01_M37_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	1	A01	M37	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A02_Y70_unkn_None	A02_Y70_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	2	A02	Y70	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A03_P92_unkn_None	A03_P92_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	3	A03	P92	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A04_A23_unkn_None	A04_A23_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	4	A04	A23	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A05_P53_unkn_None	A05_P53_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	5	A05	P53	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A06_M173_unkn_None	A06_M173_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	6	A06	M173	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A07_T68_unkn_None	A07_T68_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	7	A07	T68	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A08_M91_unkn_None	A08_M91_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	8	A08	M91	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A09_A59_unkn_None	A09_A59_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	9	A09	A59	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A10_A13_unkn_None	A10_A13_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	10	A10	A13	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A11_S4_unkn_None	A11_S4_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	11	A11	S4	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
A12_G16_unkn_None	A12_G16_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	12	A12	G16	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B01_M38_unkn_None	B01_M38_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	13	B01	M38	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B02_M135_unkn_None	B02_M135_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	14	B02	M135	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B03_P104_unkn_None	B03_P104_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	15	B03	P104	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B04_A25_unkn_None	B04_A25_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	16	B04	A25	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B05_P72_unkn_None	B05_P72_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	17	B05	P72	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B06_M174_unkn_None	B06_M174_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	18	B06	M174	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B07_T69_unkn_None	B07_T69_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	19	B07	T69	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B08_Z21_unkn_None	B08_Z21_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	20	B08	Z21	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B09_A61_unkn_None	B09_A61_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	21	B09	A61	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B10_A14_unkn_None	B10_A14_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	22	B10	A14	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE
B11_S5_unkn_None	B11_S5_unkn_None	8d767ea2-aaaf-4d95-ac40-018187446bb6	fd28fb47-c8b9-429f-8cf8-51e7efe7637a	23	B11	S5	None	SYBR Green I	unkn	TRUE	TRUE

Şekil 3.5 RDML dosya yapısı

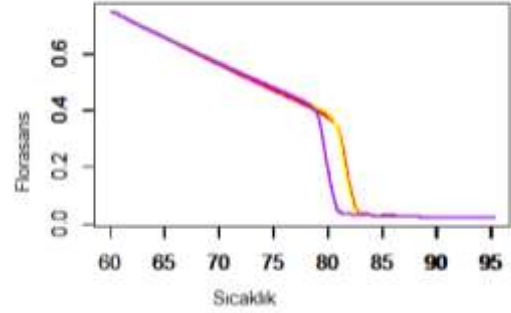
3.3.3. Veri Ön işleme

Örnekler zaman kayması, veri miktarına bağlı gecikmeler, donanımsal etmenler gibi çeşitli sebeplerden dolayı aynı sıcaklık skalasında değer üretmemektedir. Depolanabilmesi ve analiz edebilmesi için eş değer aralıklarına interpolasyonu yapılması gerekmektedir.

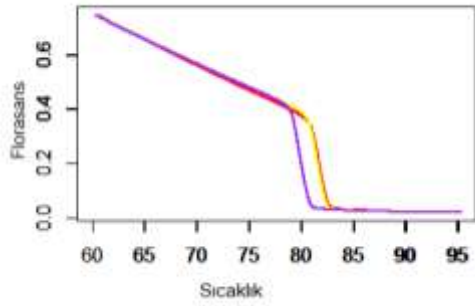
Zoo kütüphanesinin na.approx metodu kural 2'ye uygulanarak bu standart sıcaklık değerleri için floresans değerleri üretilmiştir. Bu metot zaman serilerinde değeri bilinmeyen veriyi değeri bilinen en yakın veriye göre belirlemektedir.



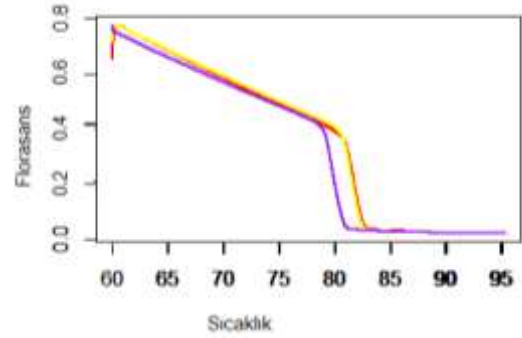
Şekil 3.6 Approx Metodu 0.1 sıcaklık aralıklı kural 2 yöntemi



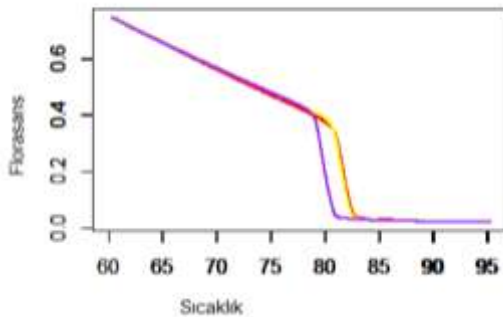
Şekil 3.9 Approx Metodu 0.3 sıcaklık aralıklı kural 2 yöntemi



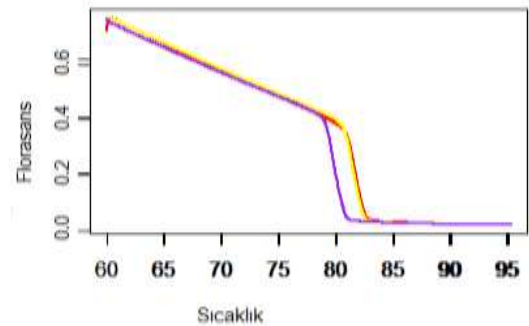
Şekil 3.7 Approx Metodu 0.1 sıcaklık aralıklı kural 1 yöntemi



Şekil 3.10 Spline Metodu 0.1 sıcaklık aralıklı

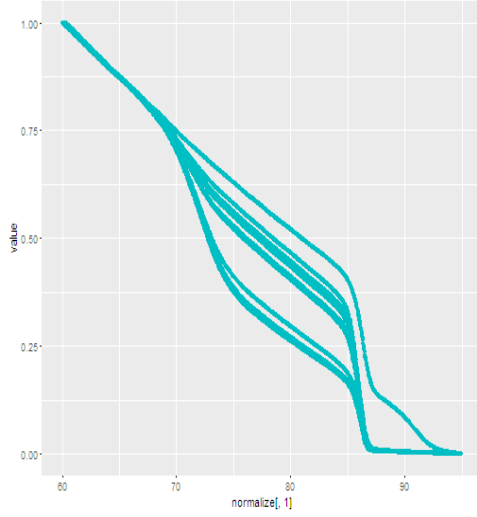


Şekil 3.8 Approx Metodu 0.3 sıcaklık aralıklı kural 1 yöntemi

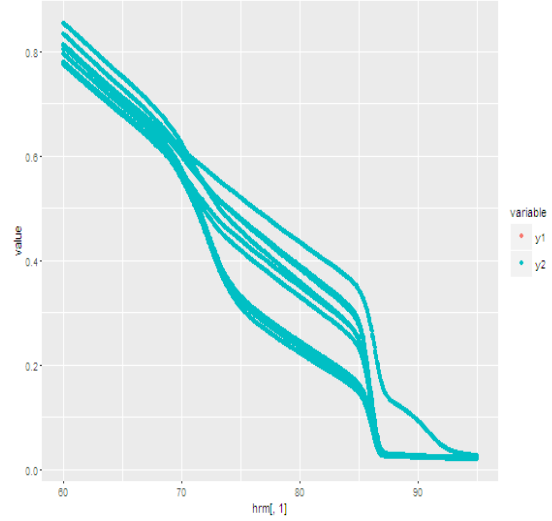


Şekil 3.11 Spline Metodu 0.3 sıcaklık aralıklı

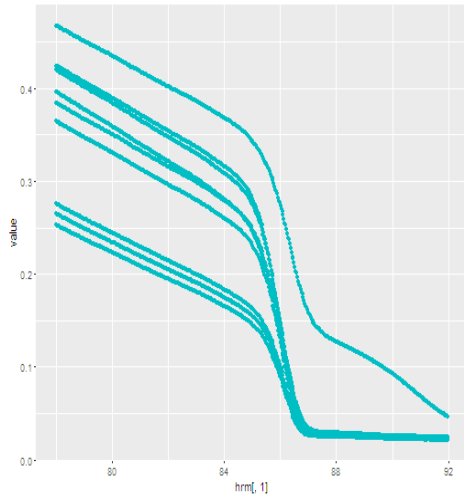
Grafikler karşılaştırıldığında aynı türler arasındaki benzerliği elimine etmeden farklı türler arasındaki farkı büyütürük doğruluğu artıran 0.03 aralıklı kural 2'ye göre approx metodu interpolasyon metodu olarak belirlenmiştir.



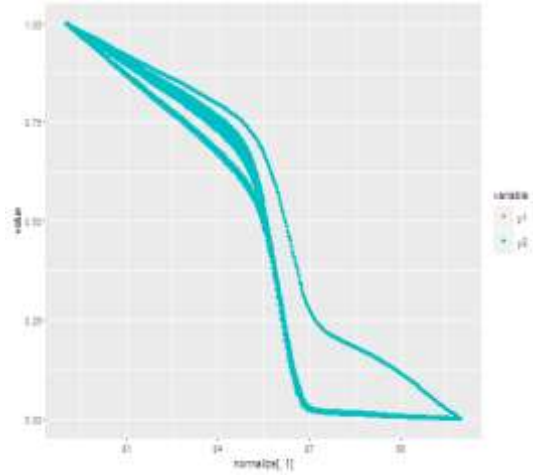
Şekil 3.12. 60-95 sıcaklık aralığında normalize hrm eğrisi



Şekil 3.13. 60-95 sıcaklık aralığındaki hrm eğrisi



Şekil 3.14. 75-95 sıcaklık aralığında hrm eğrisi



Şekil 3.15. 75-95 sıcaklık aralığında normalize hrm eğrisi

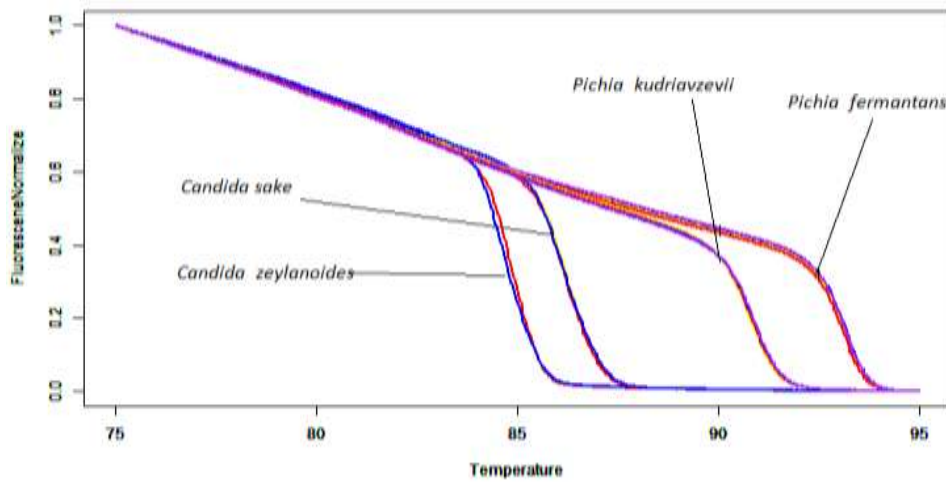
Cihazlardaki skala farklılıklarından ve deneysel koşulların değişiminde farklı floresans değerleri üretilmektedir. Bu durum yukarıdaki grafiklerde de görüldüğü gibi hataya neden olmaktadır. Bu sebeple reaksiyonun gerçekleştiği 65-95 sıcaklık aralığındaki normalize hrm eğrisi standart eğri olarak kabul edilmiştir.

En çok kullanılan normalizasyon metotlarından biri olan min-max normalizasyon metodu ile floresanslık değeri 0 ile 1 arasında ölçeklenmiştir.

$$x' := (x - x_{\min}) / (x_{\max} - x_{\min})$$

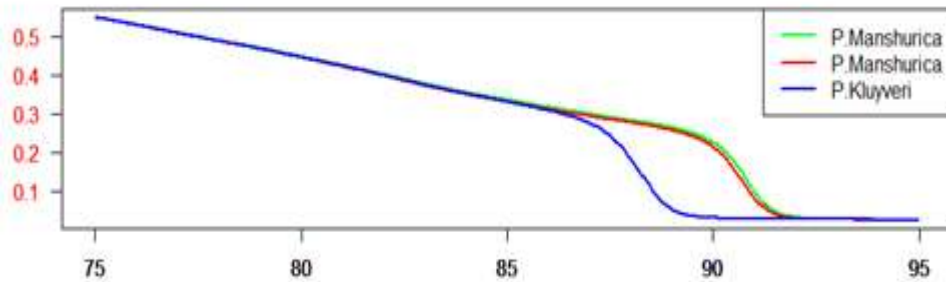
Grafiklerin elde edilmesi:

R dilinde graphics kütüphanesinin plot ve par fonksiyonları kullanılarak deneyden bağımsız olarak tüm örneklerin gösterimi sağlanmıştır.



Şekil 3.16 Farklı platelerden alınan örneklerin görselleştirilmesi

Şekilde 3.16'da 2 farklı plateden alınan 12 örneğin grafik şeklinde gösterilmiştir. Aynı türden örnekler birbirine çok yakınken, farklı türdeki örnekler arasındaki mesafe oldukça artırılmıştır.



Şekil 3.17. 3 farklı örneğin sıcaklık-floresans grafiği

3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Test denemeleri

3.4.1. MFMASSisteminin API 32 C kiti ile karşılaştırılması

Proje kapsamında geliştirilen tanımlama sisteminin test denemeleri için, maya türlerinin identifikasyonunda yaygın olarak kullanılan API ID 32 C (bioMerieux, Fransa) ticari test kitleri kullanılmıştır. Bu amaçla standart maya suşlarının identifikasyonunda ticari API kiti ile birlikte proje kapsamında geliştirilen tanımlama yöntemi eş zamanlı uygulanarak her iki sistem birbiri ile karşılaştırılmıştır.

Bu amaçla standart maya suşlarının 24 saat kültürleri API süspansiyon medium içerisinde süspanse edilerek yoğunlukları MacFarland 2'ye ayarlanmıştır. Daha sonra ID 32 striplerindeki herbir kuyucuğa bu çözeltiden 135 µl eklenerek 28 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda stripler okunması ve suşların tanımlanması için mini API cihazı kullanılmıştır.

3.4.2 Validasyon testleri

Ayrıca farklı tür mayalardan seçilecek 3 standart suş *C. sake*(NRRL Y-17808), *P. fermentans* (NRRL Y-11506), *P. kluyveri* (NRRL Y-17724) kullanılarak yöntemin seçimliliğine yönelik çapraz kontrollerinin yanında, yöntemin kesinlik ve doğruluk analizi ve diğer validasyon testleri yapılarak sistemin başarısı test edilecektir.

4 BULGULAR

4.1 Gıda örneklerinden izole edilerek tanımlanan maya suşları

Çeşitli gıda örneklerinden izole edilerek genotipik yöntemlerle tanımlanan maya suşları proje kapsamında geliştirilecek maya tanımlama kitinin veri tabanını oluşturmak üzere kullanılmıştır. Bu amaçla toplam 63 gıda örneğinden seri dilüsyonlar hazırlanarak DRBC Agar besiyerine ekim yapılmış ve inkübasyon süresi sonunda gelişen maya kolonileri sayılmıştır. Analiz edilen gıda örneklerinde maya sayısının $3,4 \times 10^{-5}$ - $7,25 \times 10^{-6}$ kob/g (ml) arasında değiştiği tespit edilmiştir.

4.1.1 Rep-PCR Fingerprint Analizi Sonuçları

Proje kapsamında rep-PCR fingerprint analizi farklı gıda örneklerinden izole edilen maya suşlarının bir ön gruplandırılmasının yapılması ve her grubu temsil edecek sayıda suşun seçilerek dizi analizi ile tanımlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla (GTG)₅ primeri kullanılarak gerçekleştirilen rep-PCR fingerprint analizi ile toplamda 912 izolat analiz edilmiştir. Maya izolatlarına ait fingerprintler, BioNumerics 7.5 (Applied Maths NV, USA) yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve türler arasında tespit edilen filogenetik ilişki Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Rep-PCR fingerprint analiz sonuçları incelendiğinde; maya suşlarının hemen hemen tamamının türe spesifik fingerprintler ürettiği gözlenmiştir. Birçok maya türünde aynı ürün grubundan izole edilen suşlar aynı clusterda kümelenirken bazı türlerde farklı clusterlar oluşturduğu gözlenmiştir. Örneğin *P. fermentans*, *H. uvarum*, *P. kudravzevi*, *P. membranifaciens*'in meyve örneklerinden izole edilen suşları aynı cluster içerisinde kümelenirken, *K. marxianus*'un yoğurttan izole edilen suşları 3 farklı cluster oluşturduğu tespit edilmiştir. Fingerprint analiz sonuçları incelendiğinde aynı tür içindeki izolatların oluşturdukları cluster'ların benzerlik oranının %85 ve üzerinde olduğu gözlenmiştir.

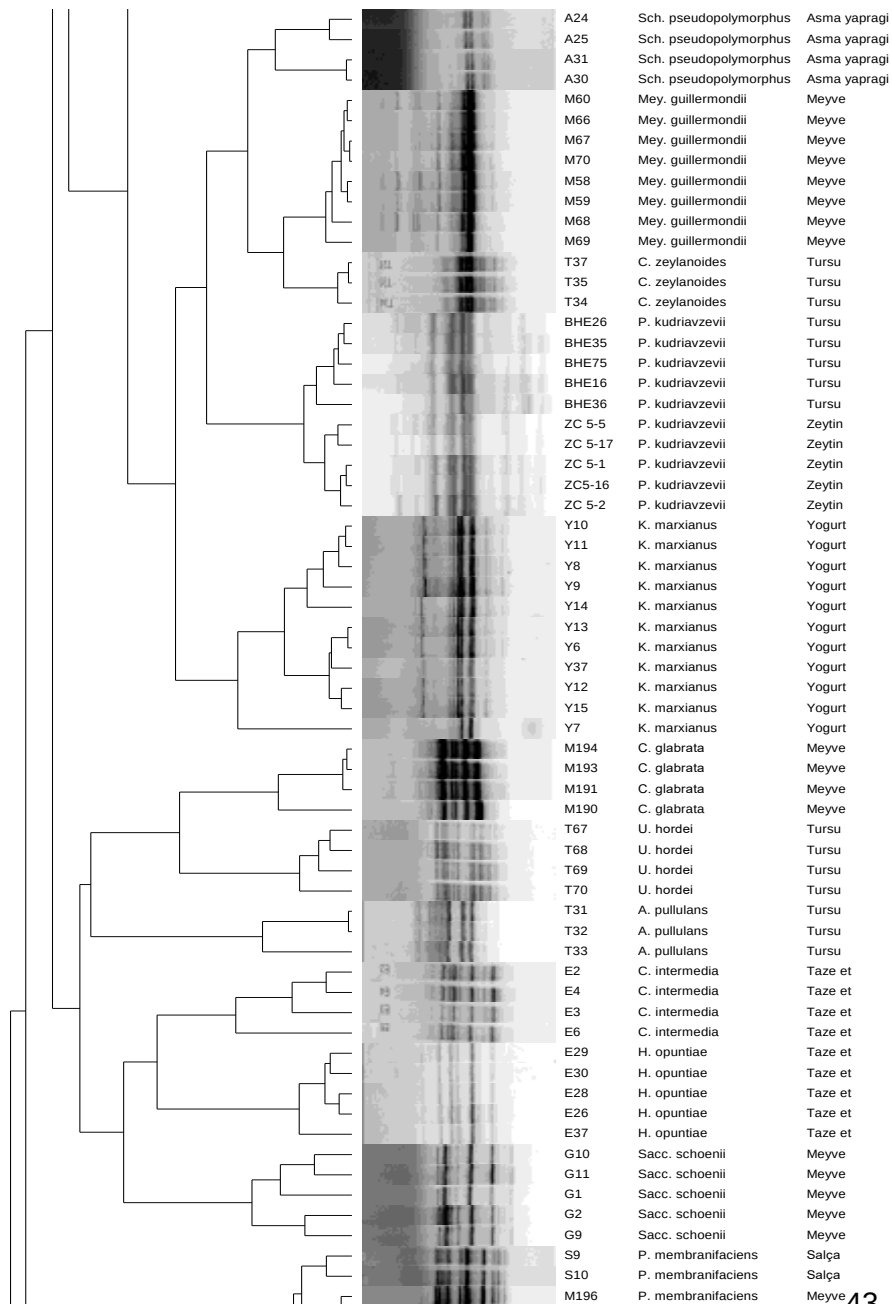
Proje kapsamında gıda örneklerinden izole edilen tüm suşların bir ön gruplandırılmasının yapıldığı rep-PCR analizinde, %85 ve altında benzerlik gösteren her bir cluster'dan o cluster'ı temsil eden sayıda izolat seçilerek dizi analizinde kullanılmıştır.

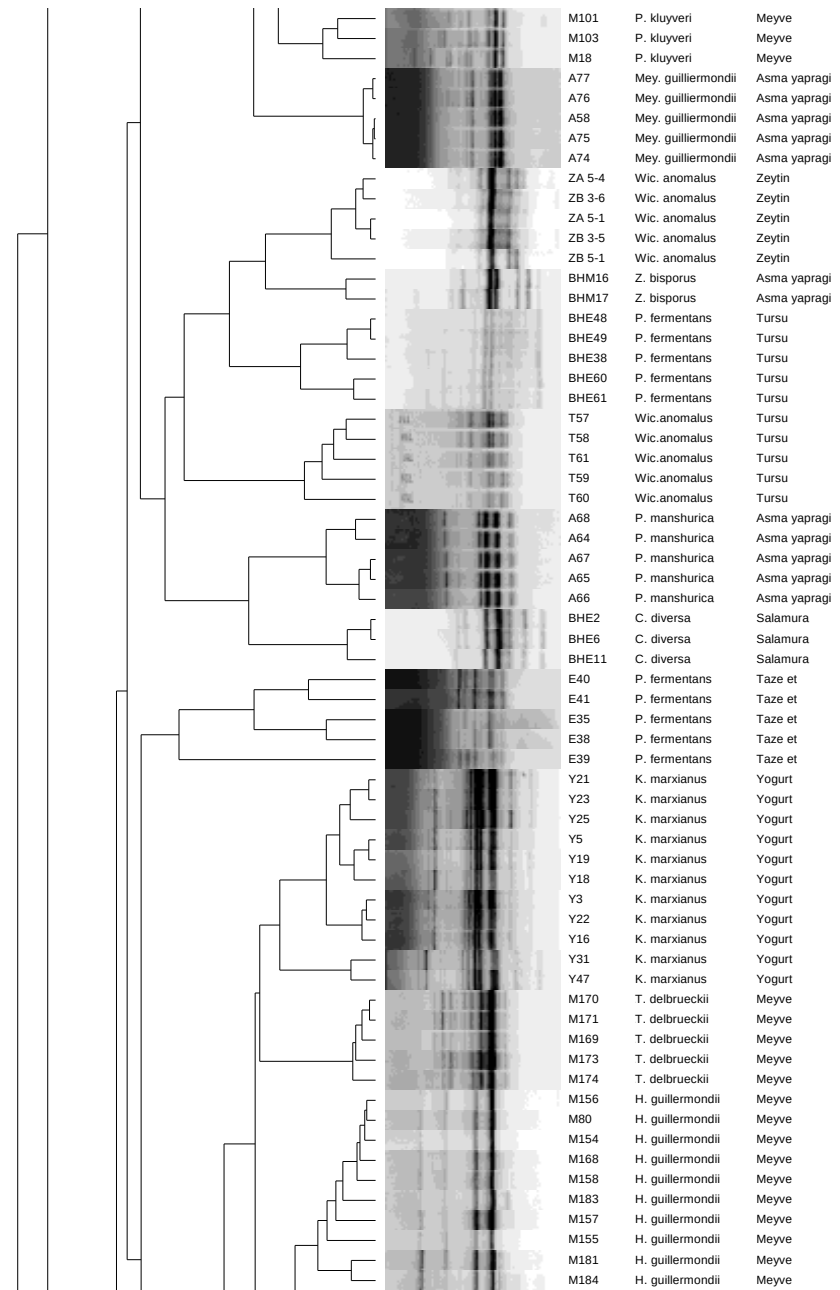
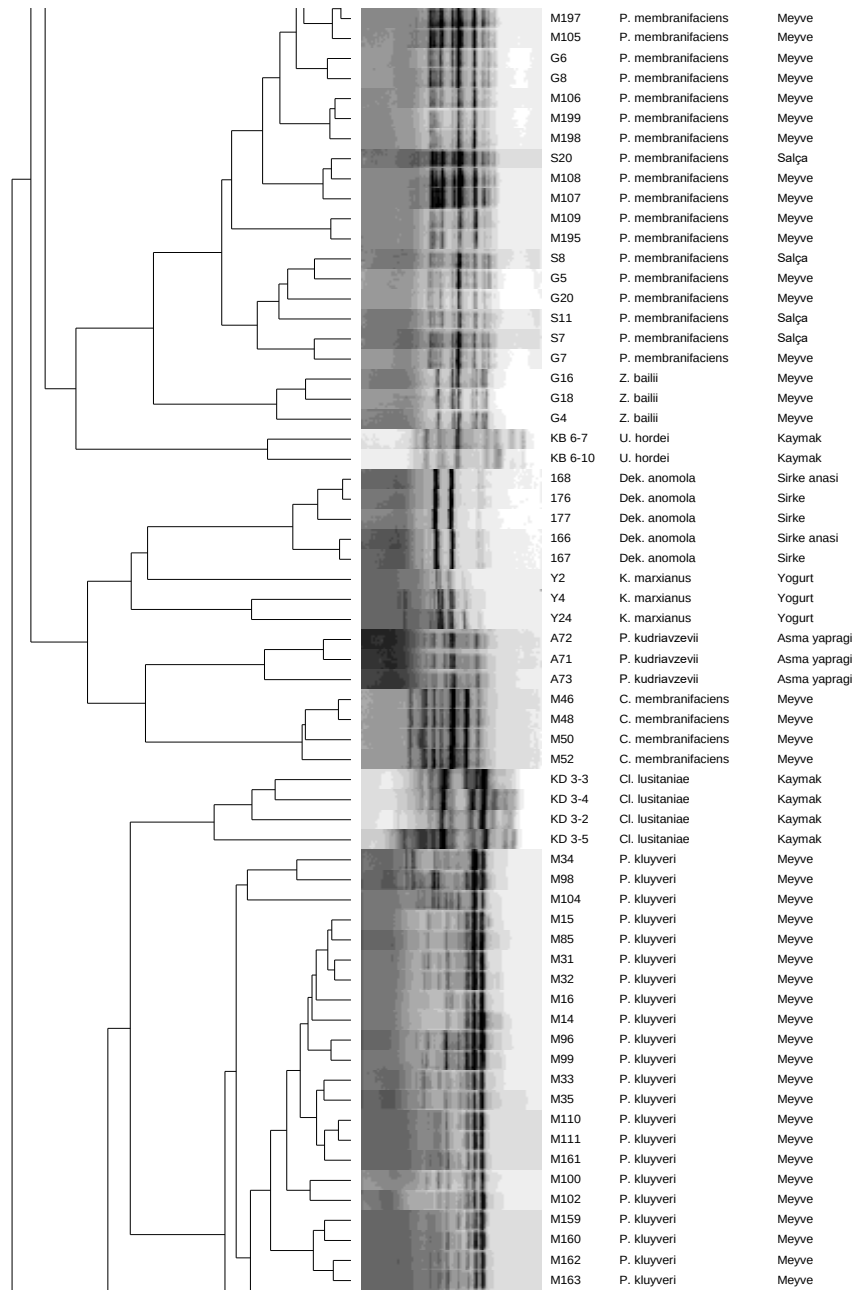
GTG5

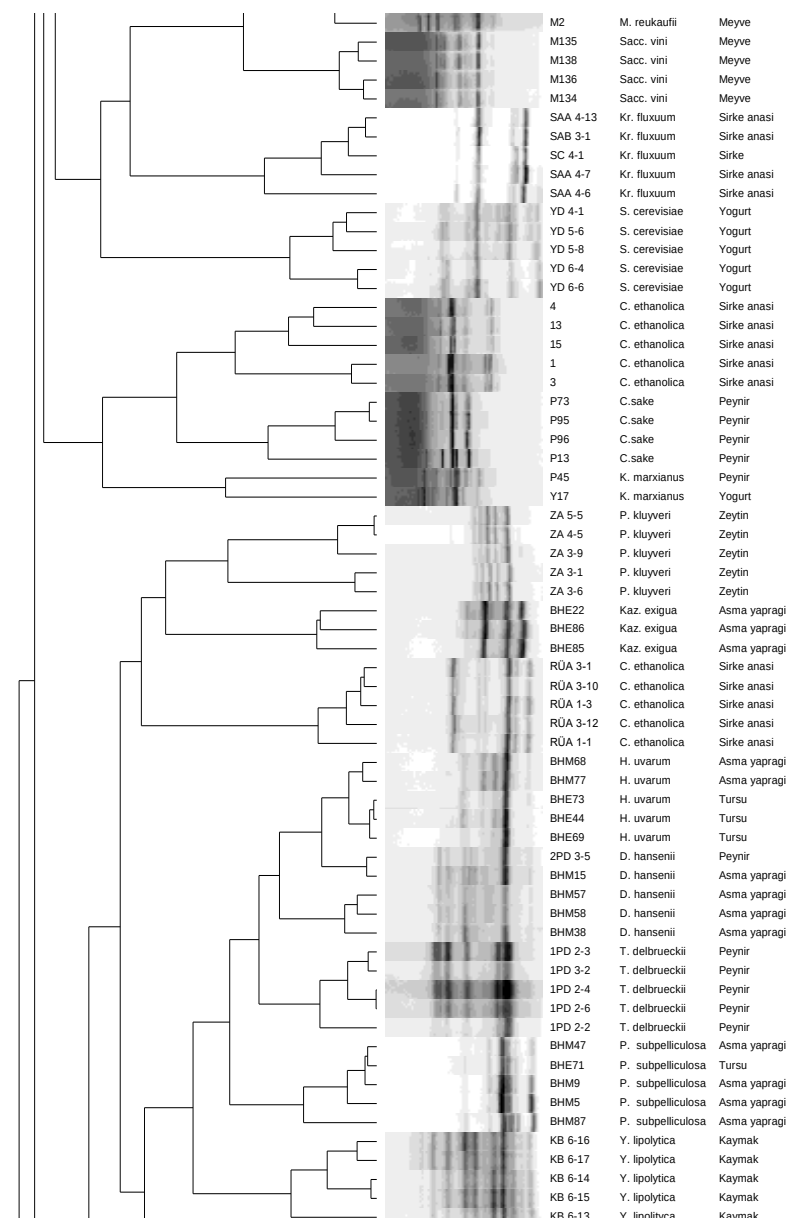
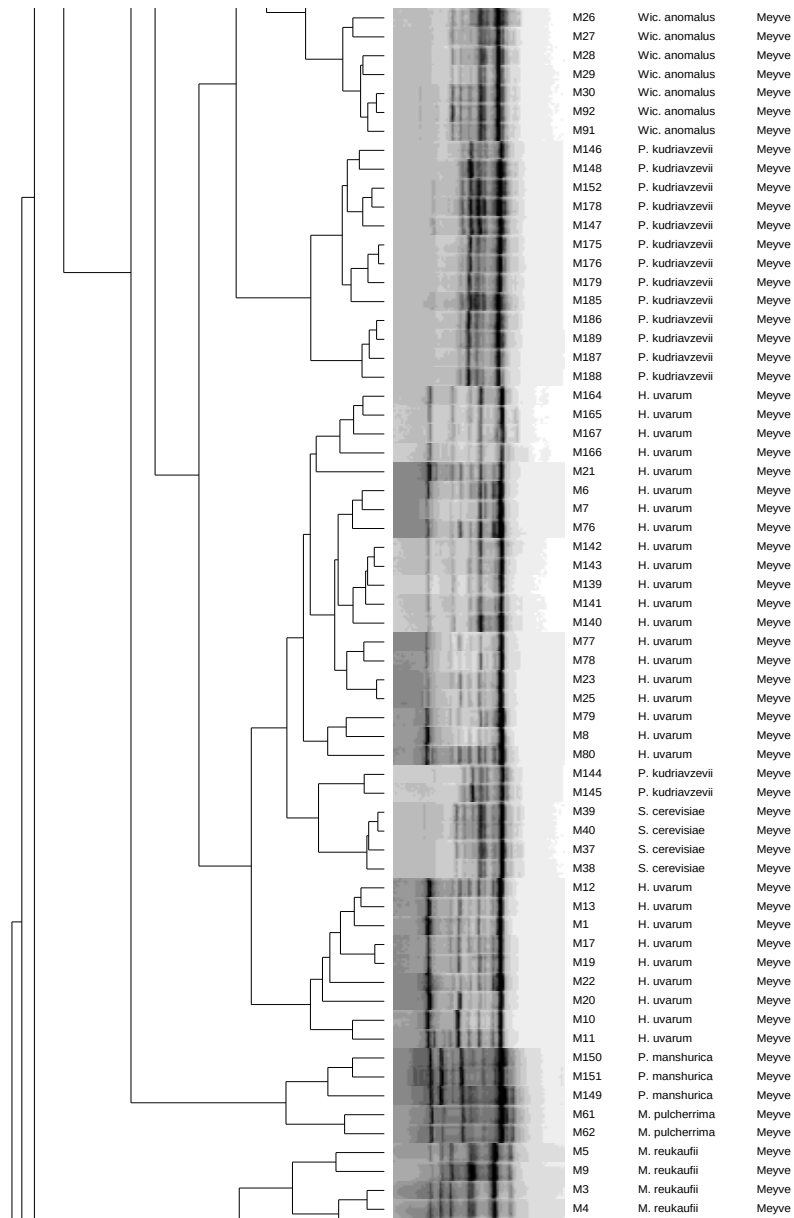


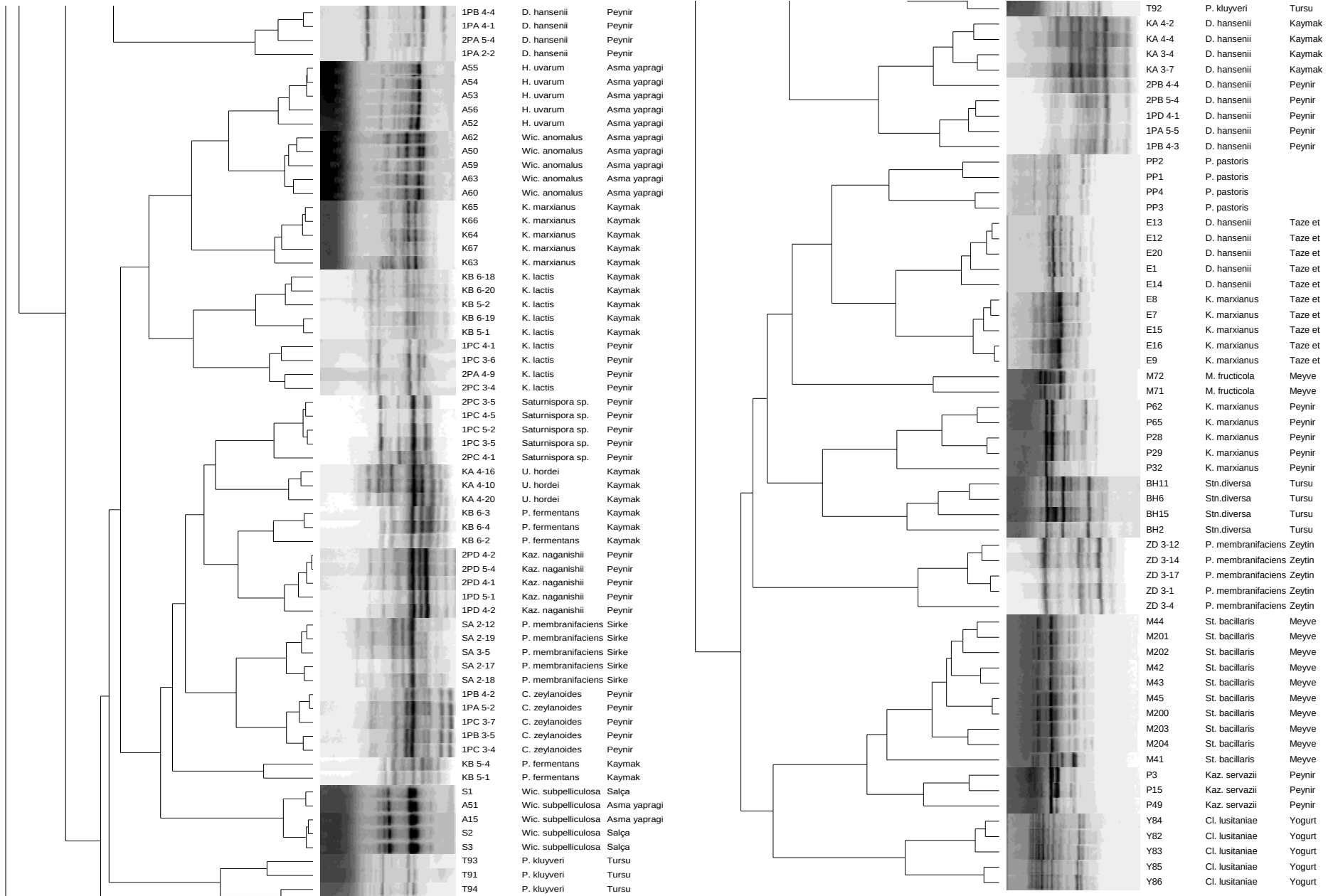
GTG5

Strain	Species	Origin
M54	C. membranifaciens	Meyve
M55	C. membranifaciens	Meyve
M53	C. membranifaciens	Meyve
M46	Yamadazyma sp.	Meyve
M48	Yamadazyma sp.	Meyve
M50	Yamadazyma sp.	Meyve
M52	Yamadazyma sp.	Meyve
Y20	K. marxianus	Yogurt
Y1	K. marxianus	Yogurt
M84	P. fermentans	Meyve
M83	P. fermentans	Meyve
M81	P. fermentans	Meyve
M122	P. fermentans	Meyve
M82	P. fermentans	Meyve
M123	P. fermentans	Meyve
T75	P. fermentans	Tursu
T83	P. fermentans	Tursu
T76	P. fermentans	Tursu
T74	P. fermentans	Tursu
ÇY1	Mey. caribbica	Çay
ÇY2	Mey. caribbica	Çay
ÇY3	Mey. caribbica	Çay
G3	P. fermentans	Meyve
G12	P. fermentans	Meyve
M125	P. fermentans	Meyve
G14	P. fermentans	Meyve
G19	P. fermentans	Meyve
G13	P. fermentans	Meyve
Y88	P. fermentans	Yogurt
Y89	P. fermentans	Yogurt
Y90	P. fermentans	Yogurt
M124	P. fermentans	Meyve
M126	P. fermentans	Meyve
T82	P. fermentans	Tursu
T81	P. fermentans	Tursu
T73	P. fermentans	Tursu
T80	P. fermentans	Tursu
Y29	K. marxianus	Yogurt
Y36	K. marxianus	Yogurt
Y26	K. marxianus	Yogurt
Y35	K. marxianus	Yogurt
Y30	K. marxianus	Yogurt
Y34	K. marxianus	Yogurt
Y33	K. marxianus	Yogurt
Y27	K. marxianus	Yogurt
Y57	K. marxianus	Yogurt
E17	C. zeylanoides	Taze et
E18	C. zeylanoides	Taze et
E25	C. zeylanoides	Taze et
E10	C. zeylanoides	Taze et
E19	C. zeylanoides	Taze et
E11	C. zeylanoides	Taze et
ZB 4-2	P. fermentans	Zeytin
ZB 3-1	P. fermentans	Zeytin
ZB 3-3	P. fermentans	Zeytin
ZB 3-4	P. fermentans	Zeytin
ZB 4-1	P. fermentans	Zeytin
E21	C. zeylanoides	Taze et
E22	C. zeylanoides	Taze et
E24	C. zeylanoides	Taze et
E23	C. zeylanoides	Taze et









Şekil 1. Maya izolatlarına ait rep – PCR analizi ile elde edilen fingerprintler kullanılarak UPGMA ile metot oluşturulan dendrogram

4.1.2 Dizi Analizi Sonuçları

Rep-PCR analizine göre gruplandırılan maya izolatlarından her grubu temsil eden sayıda izolat seçilmiş ve seçilen izolatların tanımlanması amacıyla dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla yaklaşık 600 bp uzunluğundaki ITS bölgesi ile 26S rRNA geni üzerinde yaklaşık 650 bp uzunluğundaki D/D2 bölgesi hedef alınmıştır. Tanımlanan maya izolatlarının örneklere göre dağılımı Tablo 4.1’de verilmiştir.

Gıda örneklerinden izole edilerek tanımlanan toplam 912 izolatın 42 maya türüne ait olduğu tespit edilmiştir. *Pichia* cinsine ait 5 tür toplam izolatların %34.6 ‘sını oluşturmuştur. Tanımlanan maya türleri içerisinde en sık izole edilen tür *P. fermentans* olmuştur. Toplam izolatların %14.14’nü oluşturan *P. fermentans*, zeytin, kaymak, yoğurt, turşu, taze et, gilaboru ve meyve örneklerinden izole edilmiştir. Bu türü takip eden 3 maya türü sırasıyla;*K. marxianus*, *P. kluyveri* ve *P. membranifaciens* olmuştur ve bu türlerin tüm izolatları içerisindeki oranının %8.11 - 8.70 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Farklı gıda örneklerinden izole edilerek tanımlanan izolatların %8.2’sini *Candida* cinsine ait 7 tür oluşturmuştur. Bunlar içerisinde en sık izole edilen *Candida* türü olarak *C. zeylanoides* birinci sırada yer alırken bunu ikinci *C. membranifaciens* izlemiştir. Diğer *Candida* türlerinin ise oranları %1’in altında kalmıştır.

Kluyvermyces türüne ait 2 tür izole tüm izolatların %9.75’ni oluşturmuştur. Bu cinse giren türlerin %90’nı oluşturan *K. marxianus* süt ürünlerinin yanında da tez et örneklerinden de izole edilmiştir.

Kazachstania cinsine ait üç tür; *Kaz. naganishii*, *Kaz. exigua* ve *Kaz. servazzii* tanımlanmıştır ve bu izolatların toplam izolatlar içerisindeki oranlarının %2.4’ü geçmediği tespit edilmiştir. Peynir, kaymak ve taze et örneklerinde izole edilen *D. hansenii*, tüm izolatların %6,58’ni, ağırlıklı olarak meyve örneklerinden izole edilen *H. uvarum* ise %5,92’ni oluşturmuştur. Toplamda 19 izolat *S. cerevisiae* olarak tanımlanmış ve yalnızca yoğurt ve meyve örneklerinden izole edilmiştir.

Proje kapsamında analiz edilen 63 gıda örneğinden izole edilerek tanımlanan maya türlerinden 22 tanesinin toplam izolatlar içerisindeki oranı %1’in altında bulunmuştur. Tanımlanan tüm türler içerisinde en düşük izolat sayısı (3 izolat), *Kaz. servazii* ve *Z. bailii* türlerinde elde edilmiştir.

Gıda örneklerinden izole edilerek tanımlanan 912 izolat ve NRRL kültür koleksiyonundan temin edilen 27 standart suş, türe spesifik HRM ve Tm verilerinin elde edilmesi ve MFMAS sistemine ait veri kütüphanesinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Tablo 4.1. Gıda örneklerinden izole edilerek genotipik yöntemlerle tanımlanan maya izolatları

izolat	peynir	zeytin	kaymak	yoğurt	sirke	salamura	turşu	taze et	meyve	asma yaprağı	gilaboru	salça	Toplam	%
<i>P. fermentans</i>		6	14	5			76	14	9		5		129	14,14
<i>K. marxianus</i>	6		5	64				5					80	8,77
<i>P. kluyveri</i>		19					5		52				76	8,33
<i>P. membranifaciens</i>							44		10	5	5	10	74	8,11
<i>D. hansenii</i>	37		18					5					60	6,58
<i>H. uvarum</i>	49									5			54	5,92
<i>Cl. lusitaniae</i>	37		5	5									47	5,15
<i>P. kudriavzevii</i>		15							15	15			45	4,93
<i>Wic.anomalous</i>		15					5		6	12			38	4,17
<i>C. zeylanoides</i>	20						6	10			1		37	4,06
<i>Dek. anomala</i>					8			6	10				21	2,3
<i>Wic. subpelliculosa</i>										16		5	21	2,3
<i>S. cerevisiae</i>				15					4				19	2,08
<i>Ustilago hordei</i>			12				5						17	1,86
<i>T. delbrueckii</i>	11								5				16	1,75
<i>C. membranifaciens</i>									15				15	1,64
<i>Kaz.naganishii</i>	15												15	1,64
<i>Mey. guilliermondii</i>									8	5			13	1,43
<i>Schwanniomyces pseudopolymorphus</i>										10			10	1,1
<i>Starmerella bacillaris</i>									10				10	1,1

<i>K. lactis</i>	4		5									9	0,99
<i>P. manshurica</i>									3	5		8	0,88
<i>Saturnispora spp.</i>	7											7	0,77
<i>Metschnikowia sp</i>									6			6	0,66
<i>Stn. diversa</i>						6						6	0,66
<i>Y. lipolytica</i>			6									6	0,66
<i>Aureobasidium pullulans</i>							5					5	0,55
<i>C. ethanolica</i>					8							5	0,55
<i>C. intermedia</i>								5				5	0,55
<i>C. glabrata</i>									5			5	0,55
<i>Kr. fluxuum</i>					9							5	0,55
<i>Met. reukaufii</i>									5			5	0,55
<i>Meyerozyma caribbica</i>									5			5	0,55
<i>Saccharomycopsis schoenii</i>											5	5	0,55
<i>C. sake</i>	4											4	0,44
<i>C.diversa</i>						4						4	0,44
<i>Kaz. exigua</i>						4						4	0,44
<i>Met. fructicola</i>									4			4	0,44
<i>Saccharomycopsis vini</i>									4			4	0,44
<i>Kaz. servazzii</i>	3											3	0,33
<i>Z. bailii</i>											3	3	0,33
Toplam	193	55	65	89	25	14	146	45	176	73	19	15	912

4.2 HRM ve Tm Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

Proje kapsamında geliştirilen MFMAS sisteminde, 8 farklı DNA fragmentinin eş zamanlı analizini gerçekleştirmek amacıyla, uzunlukları 140-260 bp arasında değişen ampliconlar üreten 8 farklı primer seti kullanılmıştır. Bu primerlerden universal U1-U2 primerleri ile NL1-LS2 primerleri dışında kalan 6 primer seti proje kapsamında dizayn edilmiştir. Bu primerlerin dizaynında, hedef DNA fragmentlerinin maya türleri arasında en fazla, aynı türün bireyleri arasında ise en az değişkenlik gösteren bölgeler olmasına dikkat edilmiştir. Primer setlerinden SS1f-SS1r, 18S rRNA geni ve CH12f-CH12r ise kromozom 12 geni üzerinde bulunurken, geriye kalan 6 primer seti 16S rRNA geni üzerindedir. Dizayn edilen primerlerin proje kapsamına dahil edilen ve veri tabanına kaydedilen tüm maya türleri için HRM ve Tm analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

U1-U2 primerlerine ait ampliconların Tm değerleri incelendiğinde (Tablo 4.2), *Z. bailii* ve *T. delbrueckii* türlerinin istatistiksel olarak tüm türlerden önemli derece farklı Tm değerleri verdiği geriye kalan türlerin ise, farklı kombinasyonlarda gruplar oluşturduğu gözlenmiştir. *Candida* cinsine ait türlerin tamamı U1-U2 primerleri ile önemli derecede farklı Tm değerleri verirken, *Pichia* cinsine giren türlerden yalnızca *P. fermentans* ve *P. kluyveri*'nin Tm değerleri istatistiki olarak birbirinden önemli derecede farklı bulunmuştur. Yine *Kazachstania*, *Saccharomycopsis* ve *Meyerozymacinsine* giren türlerin ayrımı mümkün olduğu halde *Hanseniasporacinsine* giren türler ayrılamamıştır.

NL1-LS2 primeri ile *S'copsis schoenii*, *S'copsis vini*, *C. sake*, *S. cerevisiae*, *Kaz. naganishii* ve *P. fermentans* diğer tüm türlerden istatistiksel olarak farklı, türe spesifik Tm değerleri verirken, diğer türler 2 veya daha fazla türle gruplar oluşturmuşlardır. Maya türlerinin U1-U2 primerleri ile ürettikleri Tm değerlerine göre oluşan gruplandırmanın NL1-LS2 primerleri ile oluşan gruplandırmadan tamamen farklı olduğu gözlenmiştir. Örneğin *Y. lipolytica* U1-U2 primeri ile *C. glabrata* ve *Dek. anomola* ile birlikte gruplanırken, NL1-LS2 primeri ile, *W. subpelliculosa*, *W. anomalus* ve *C. zeylanoides* türlerinden oluşan grubun içerisinde yer almıştır. Diğer primerler ile de bu maya türleri, farklı türlerden oluşan gruplar içerisinde yer almışlardır (Tablo 4.3).

İlk kez bu çalışma kapsamında dizayn edilen SS1f-SS2r primeri ile *Y. lipolytica*, *Kr. fluxuum*, *Met. reufkaufii*, *C. ethanolica* ve *A. pullulans* türe spesifik Tm değerleri üretmişlerdir (Tablo

4.4). CH12f-CH12r primeri ise, *S'copsis vini*, *S. cerevisiae*, *Kaz. servazzii*, *C. intermedia*, *P. fermentans* ve *Saturnispora spp.* türlerinde diğer maya türlerinden önemli derecede farklı türe spesifik Tm değerleri üretmiştir (Tablo 4.5)

Esr1-Esr2 primeri ile yalnızca *P. fermentans* ve *P. pastoris*, Fzg1-Fzg2 primeri ile ise, *S'copsis schoenii*, *Saturnispora spp.*, *P. kluyveri* ve *P. manshurica* türleri türe spesifik Tm değerleri vermiş, bunların dışında kalan türler de her iki primer ile farklı kombinasyonlarda gruplar oluşturmuştur (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

C. intermedia ve *Y. lipolytica*'nın türe spesifik Tm değeri verdiği 2. primer MnF-MnR primerleri olmuştur. MnF-MnR primerleri ile bu türlerin dışında *Saturnispora spp.*, *P. manshurica*, *P. kudriavzevii* ve *Stn. diversa* türleri de istatistiksel olarak diğer türlerden farklı Tm değerleri vermiştir (Tablo 4.8). Son olarak My3f-My3r primeri ile de yalnızca *Met. pulcherrima* türe spesifik Tm değeri üretmiştir (Tablo 4.9). Bunların dışında kalanlar diğer primerler de olduğu gibi farklı kombinasyonlarda gruplar oluşturmuşlardır. Dolayısıyla her bir türün 8 farklı primerle oluşturduğu Tm değerleri türe spesifik bir fingerprint oluşturmuştur.

Tablo 4.2. U1-U2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	
<i>H. guilliermondii</i>	79,805	0,183	a
<i>H. uvarum</i>	79,933	0,106	a
<i>C. diversa</i>	80,498	0,237	b
<i>Stn. diversa</i>	80,639	0,205	b
<i>Kr. fluxuum</i>	81,545	0,183	c
<i>Met. reufkaufii</i>	81,553	0,183	c
<i>C. zeylanoides</i>	81,804	0,106	c d
<i>St. bacillaris</i>	81,804	0,183	c d
<i>K. lactis</i>	82,285	0,137	d e
<i>Mey. caribbica</i>	82,297	0,237	d e
<i>Mey. guilliermondii</i>	82,402	0,130	e f
<i>K. marxianus</i>	82,436	0,106	e f
<i>Kaz. servazzii</i>	82,496	0,145	e f
<i>W. subpelliculosa</i>	82,550	0,130	e f
<i>P. Pastoris</i>	82,590	0,205	e f
<i>D. hansenii</i>	82,616	0,106	e f g
<i>Sch. pseudopolymorphus</i>	82,688	0,183	e f g h
<i>S'copsis vini</i>	82,780	0,205	e f g h
<i>C. membranifaciens</i>	82,933	0,237	f g h i
<i>Yamadazyma sp</i>	82,971	0,183	f g h i
<i>S'copsis schoenii</i>	83,174	0,183	g h i
<i>W. anomalus</i>	83,195	0,092	h i
<i>S. cerevisiae</i>	83,209	0,137	h i
<i>Kaz. naganishii</i>	83,423	0,183	i J
<i>C. sake</i>	83,784	0,205	J k
<i>Kaz. exigua</i>	84,053	0,237	k l
<i>T. delbrueckii</i>	84,421	0,130	l
<i>Z. bailii</i>	85,057	0,237	m
<i>Metschnikowia sp.</i>	85,505	0,237	m n
<i>Met. fructicola</i>	85,550	0,290	m n
<i>C. intermedia</i>	85,565	0,183	m n
<i>Met. pulcherrima</i>	85,718	0,290	n o
<i>U. hordei</i>	86,016	0,130	n o p
<i>P. kluyveri</i>	86,194	0,118	o p
<i>A. pullulans</i>	86,305	0,237	p
<i>Cl.lusitaniae</i>	86,481	0,137	p
<i>Y. lipolytica</i>	87,008	0,183	q
<i>C. glabrata</i>	87,050	0,205	q
<i>Dek. anomala</i>	87,303	0,183	q
<i>C. ethanolica</i>	88,797	0,183	r
<i>P. membranifaciens</i>	88,995	0,092	r
<i>P. kudriavzevii</i>	89,220	0,103	r
<i>P. manshurica</i>	89,249	0,145	r
<i>Saturnispora spp.</i>	90,468	0,183	s
<i>P. fermentans</i>	90,699	0,078	s

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

Tablo 4.3. NL1-LS2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	
<i>S'copsis schoenii</i>	79,575	0,139	a
<i>S'copsis vini</i>	80,020	0,155	b
<i>Y. lipolytica</i>	81,144	0,139	c
<i>W. anomalus</i>	81,238	0,070	c
<i>W. subpelliculosa</i>	81,242	0,098	c
<i>C. zeylanoides</i>	81,320	0,080	c
<i>C. sake</i>	81,739	0,155	d
<i>D. hansenii</i>	81,856	0,080	d e
<i>A. pullulans</i>	81,857	0,180	d e
<i>Sch.</i>	81,878	0,139	d e
<i>Yamadazyma sp</i>	81,945	0,139	d e
<i>C. membranifaciens</i>	81,958	0,180	d e f
<i>Z. bailii</i>	81,967	0,180	d e f
<i>St. bacillaris</i>	82,113	0,139	d e f
<i>T. delbrueckii</i>	82,122	0,098	d e f
<i>H. guilliermondii</i>	82,225	0,139	e f g
<i>H. uvarum</i>	82,355	0,080	f g
<i>C. glabrata</i>	82,638	0,155	g h
<i>Kr. fluxuum</i>	82,766	0,139	h
<i>U. hordei</i>	82,844	0,098	h
<i>S. cerevisiae</i>	83,248	0,104	i
<i>K. marxianus</i>	84,008	0,080	j
<i>Met. fructicola</i>	84,108	0,220	j k
<i>K. lactis</i>	84,134	0,104	j k
<i>Metschnikowia sp.</i>	84,160	0,180	j k
<i>Met. reufkaufii</i>	84,515	0,139	k l
<i>Kaz. exigua</i>	84,553	0,180	k l
<i>Mey. guilliermondii</i>	84,759	0,098	l m
<i>C. intermedia</i>	84,866	0,139	l m
<i>Dek. anomala</i>	85,071	0,139	m n
<i>Mey. caribbica</i>	85,172	0,180	m n
<i>Kaz. servazzii</i>	85,473	0,110	n
<i>P. kluyveri</i>	85,491	0,090	n
<i>P. Pastoris</i>	85,495	0,155	n
<i>Met. pulcherrima</i>	85,503	0,220	n
<i>Stn. diversa</i>	86,729	0,155	o
<i>P. manshurica</i>	86,771	0,110	o
<i>P. membranifaciens</i>	86,869	0,070	o
<i>C. diversa</i>	86,897	0,180	o p
<i>C. ethanolica</i>	87,022	0,139	o p
<i>P. kudriavzevii</i>	87,168	0,078	p
<i>Kaz. naganishii</i>	87,597	0,139	q
<i>P. fermentans</i>	87,939	0,059	r
<i>Cl.lusitaniae</i>	88,168	0,104	r s
<i>Saturnispora spp.</i>	88,411	0,139	s

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

Tablo 4.4. SS1f-SS1r primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	Maya
<i>Y. lipolytica</i>	78,261	0,160	a
<i>C. diversa</i>	78,875	0,206	b
<i>Stn. diversa</i>	78,982	0,178	b
<i>H. guilliermondii</i>	79,135	0,160	b c
<i>H. uvarum</i>	79,476	0,092	c
<i>Kr. fluxuum</i>	80,434	0,160	d
<i>Met. reufkaufii</i>	81,033	0,160	e
<i>C. sake</i>	81,601	0,178	f
<i>S'copsis schoenii</i>	81,839	0,160	f
<i>S'copsis vini</i>	81,896	0,178	f
<i>Kaz. exigua</i>	82,040	0,206	f g
<i>K. marxianus</i>	82,471	0,092	g h
<i>P. kluyveri</i>	82,889	0,103	h i
<i>K. lactis</i>	82,942	0,119	i
<i>Met. fructicola</i>	82,987	0,252	i
<i>S. cerevisiae</i>	83,142	0,119	i j
<i>Yamadazyma sp</i>	83,475	0,160	j k
<i>C. membranifaciens</i>	83,523	0,206	j k
<i>T. delbrueckii</i>	83,529	0,113	j k
<i>Metschnikowia sp.</i>	83,538	0,206	j k
<i>W. subpelliculosa</i>	83,676	0,113	k l
<i>Kaz. servazzii</i>	83,947	0,126	k l m
<i>C. zeylanoides</i>	84,074	0,092	l m n
<i>Met. pulcherrima</i>	84,152	0,252	m n o
<i>Mey. guilliermondii</i>	84,242	0,113	m n o p
<i>D. hansenii</i>	84,261	0,092	m n o p
<i>Mey. caribbica</i>	84,282	0,206	m n o p
<i>Z. bailii</i>	84,333	0,206	m n o p
<i>W. anomalus</i>	84,430	0,080	m n o p q
<i>St. bacillaris</i>	84,468	0,160	n o p q r
<i>P. Pastoris</i>	84,485	0,178	n o p q r
<i>Kaz. naganishii</i>	84,638	0,160	o p q r s
<i>C. glabrata</i>	84,686	0,178	p q r s
<i>U. hordei</i>	84,890	0,113	q r s t
<i>Sch.</i>	84,960	0,160	r s t u
<i>P. fermentans</i>	85,041	0,067	s t u
<i>P. kudriavzevii</i>	85,101	0,089	s t u
<i>Dek. anomala</i>	85,300	0,160	t u
<i>P. membranifaciens</i>	85,445	0,080	u v
<i>P. manshurica</i>	85,446	0,126	u v
<i>C. ethanolica</i>	85,794	0,160	v
<i>Cl.lusitaniae</i>	86,609	0,119	w
<i>C. intermedia</i>	86,859	0,160	w
<i>Saturnispora spp.</i>	88,115	0,160	x
<i>A. pullulans</i>	88,957	0,206	y

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

Tablo 4.5. CH12f-CH12r primeri elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	
<i>Y. lipolytica</i>	79,486	0,11	a
<i>S'copsis schoenii</i>	79,737	0,11	a
<i>S'copsis vini</i>	80,205	0,13	b
<i>C. zeylanoides</i>	80,976	0,06	c
<i>W. subpelliculosa</i>	81,077	0,08	c
<i>C. membranifaciens</i>	81,112	0,15	c
<i>Yamadazyma sp</i>	81,141	0,11	c
<i>C. sake</i>	81,169	0,13	c d
<i>Mey. guilliermondii</i>	81,480	0,08	d e
<i>D. hansenii</i>	81,547	0,06	e
<i>P. Pastoris</i>	81,698	0,13	e
<i>Met. reufkaufii</i>	81,735	0,11	e
<i>Mey. caribbica</i>	81,805	0,15	e
<i>St. bacillaris</i>	82,302	0,11	f
<i>Sch.</i>	82,365	0,11	f g
<i>Stn. diversa</i>	82,559	0,13	f g h
<i>H. uvarum</i>	82,656	0,06	g h
<i>W. anomalus</i>	82,660	0,05	g h
<i>H. guilliermondii</i>	82,760	0,11	h
<i>U. hordei</i>	82,907	0,08	h
<i>T. delbrueckii</i>	83,659	0,08	i
<i>A. pullulans</i>	83,680	0,15	i
<i>Kr. fluxuum</i>	83,723	0,11	i
<i>Met. fructicola</i>	84,363	0,18	j
<i>Metschnikowia sp.</i>	84,393	0,15	j
<i>K. marxianus</i>	84,402	0,06	j
<i>Met. pulcherrima</i>	84,425	0,18	j
<i>K. lactis</i>	84,773	0,08	k
<i>Dek. anomala</i>	85,087	0,11	k
<i>S. cerevisiae</i>	85,516	0,08	l
<i>Kaz. servazzii</i>	85,844	0,09	m
<i>C. intermedia</i>	86,182	0,11	n
<i>Kaz. exigua</i>	86,617	0,15	o
<i>Z. bailii</i>	86,725	0,15	o
<i>Cl.lusitaniae</i>	86,925	0,08	o
<i>C. diversa</i>	87,272	0,15	p
<i>Kaz. naganishii</i>	87,325	0,11	p
<i>C. glabrata</i>	87,415	0,13	p
<i>P. kluyveri</i>	87,804	0,07	q
<i>C. ethanolica</i>	87,840	0,11	q
<i>P. membranifaciens</i>	88,778	0,05	r
<i>P. manshurica</i>	89,106	0,09	s
<i>P. kudriavzevii</i>	89,178	0,06	s
<i>P. fermentans</i>	90,092	0,04	t
<i>Saturnispora spp.</i>	90,603	0,11	u

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

Tablo 4.6. Esr1-Esr2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	
<i>P. pastoris</i>	77,348	77,805	a
<i>H. guilliermondii</i>	80,066	80,475	b
<i>H. uvarum</i>	80,535	80,771	b
<i>C. membranifaciens</i>	81,403	81,931	c
<i>Yamadazyma sp</i>	81,434	81,843	c
<i>Stn. diversa</i>	81,639	82,096	c
<i>Kr. fluxuum</i>	81,778	82,187	c d
<i>S'copsis vini</i>	82,323	82,780	d e
<i>W. subpelliculosa</i>	82,618	82,907	e f
<i>W. anomalus</i>	82,959	83,163	f
<i>St. bacillaris</i>	83,656	84,065	g
<i>D. hansenii</i>	83,925	84,161	g
<i>S'copsis schoenii</i>	84,545	84,954	h
<i>Met. reufkaufii</i>	84,644	85,053	h i
<i>Mey. guilliermondii</i>	84,847	85,136	h i
<i>Mey. caribbica</i>	84,907	85,435	h i
<i>C. zeylanoides</i>	84,979	85,215	h i
<i>Sch.pseudopolymorphus</i>	85,238	85,647	i j
<i>Met. pulcherrima</i>	85,788	86,434	j k
<i>Metschnikowia sp.</i>	86,277	86,805	k
<i>C. sake</i>	86,288	86,745	k
<i>Met. fructicola</i>	86,623	87,269	k l
<i>U. hordei</i>	87,083	87,372	l
<i>K. marxianus</i>	87,099	87,335	l
<i>S. cerevisiae</i>	87,191	87,495	l m
<i>Cl.lusitaniae</i>	87,279	87,584	l m
<i>Kaz. servazzii</i>	87,314	87,637	l m
<i>Y. lipolytica</i>	87,463	87,872	l m
<i>T. delbrueckii</i>	87,504	87,793	l m
<i>Kaz. exigua</i>	87,570	88,098	l m n
<i>K. lactis</i>	87,787	88,092	m n
<i>P. kluyveri</i>	87,808	88,072	m n
<i>C. diversa</i>	87,863	88,391	m n
<i>Dek. anomala</i>	88,250	88,659	n
<i>Z. bailii</i>	88,307	88,835	n
<i>C. intermedia</i>	89,041	89,450	o
<i>A. pullulans</i>	89,512	90,040	o p
<i>Kaz. naganishii</i>	89,701	90,110	p
<i>Saturnispora spp.</i>	89,877	90,286	p
<i>C. glabrata</i>	90,104	90,561	p
<i>P. manshurica</i>	90,761	91,084	q
<i>P. kudriavzevii</i>	90,779	91,007	q
<i>P. membranifaciens</i>	90,782	90,986	q
<i>C. ethanolica</i>	90,823	91,232	q
<i>P. fermentans</i>	92,981	93,154	r

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

Tablo 4.7. Fzg1-Fzg2 primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	
<i>S'copsis schoenii</i>	82,030	0,13	a
<i>Sch.</i>	83,068	0,13	b
<i>C. sake</i>	83,070	0,15	b
<i>C. zeylanoides</i>	83,403	0,08	b c
<i>W. subpelliculosa</i>	83,461	0,09	b c
<i>W. anomalus</i>	83,463	0,07	b c
<i>K. marxianus</i>	83,585	0,08	c d
<i>D. hansenii</i>	83,755	0,08	c d e
<i>C. membranifaciens</i>	83,882	0,18	d e
<i>S'copsis vini</i>	83,974	0,15	d e f
<i>Mey. guilliermondii</i>	84,093	0,09	e f g
<i>Mey. caribbica</i>	84,152	0,18	e f g
<i>Kr. fluxuum</i>	84,152	0,13	e f g
<i>K. lactis</i>	84,153	0,10	e f g
<i>Yamadazyma sp</i>	84,380	0,13	f g h
<i>S. cerevisiae</i>	84,451	0,10	g h i
<i>St. bacillaris</i>	84,504	0,13	g h i
<i>C. intermedia</i>	84,601	0,13	h i
<i>Z. bailii</i>	84,640	0,18	h i j
<i>Kaz. servazzii</i>	84,686	0,11	h i j k
<i>H. uvarum</i>	84,774	0,08	h i j k l
<i>Cl.lusitaniae</i>	84,832	0,10	i j k l
<i>H. guilliermondii</i>	84,862	0,13	i j k l
<i>Met. pulcherrima</i>	85,065	0,22	j k l m
<i>Met. reufkaufii</i>	85,097	0,13	k l m
<i>Met. fructicola</i>	85,138	0,22	l m n
<i>U. hordei</i>	85,294	0,09	m n o
<i>Metschnikowia sp.</i>	85,307	0,18	m n o
<i>P. Pastoris</i>	85,313	0,15	m n o
<i>A. pullulans</i>	85,372	0,18	m n o
<i>Dek. anomala</i>	85,468	0,13	m n o p
<i>Y. lipolytica</i>	85,553	0,13	n o p
<i>T. delbrueckii</i>	85,649	0,09	o p q
<i>Kaz. exigua</i>	85,860	0,18	p q r
<i>Kaz. naganishii</i>	86,014	0,13	q r
<i>C. glabrata</i>	86,225	0,15	r
<i>Saturnispora spp.</i>	86,739	0,13	s
<i>P. kluyveri</i>	87,223	0,09	t
<i>Stn. diversa</i>	87,458	0,15	t u
<i>P. membranifaciens</i>	87,509	0,07	t u v
<i>C. diversa</i>	87,578	0,18	t u v
<i>P. fermentans</i>	87,753	0,05	u v
<i>C. ethanolica</i>	87,900	0,13	v
<i>P. kudriavzevii</i>	87,900	0,07	v
<i>P. manshurica</i>	89,203	0,11	w

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

Tablo 4.8. MnF-MnR primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	
<i>Y. lipolytica</i>	80,054	0,10	a
<i>W. anomalus</i>	81,144	0,05	b
<i>W. subpelliculosa</i>	81,236	0,07	b
<i>Sch.</i>	81,239	0,10	b
<i>D. hansenii</i>	81,255	0,06	b
<i>C. sake</i>	81,430	0,11	b c
<i>Kr. fluxuum</i>	81,438	0,10	b c
<i>C. zeylanoides</i>	81,447	0,06	b c
<i>Mey. guilliermondii</i>	81,703	0,07	c d
<i>Kaz. exigua</i>	81,720	0,13	c d e
<i>Mey. caribbica</i>	81,765	0,13	d e
<i>Yamadazyma sp</i>	81,817	0,10	d e
<i>C. membranifaciens</i>	81,833	0,13	d e
<i>St. bacillaris</i>	81,875	0,10	d e
<i>S'copsis schoenii</i>	82,044	0,10	e f
<i>S'copsis vini</i>	82,183	0,11	f g
<i>H. uvarum</i>	82,199	0,06	f g h
<i>H. guilliermondii</i>	82,202	0,10	f g h
<i>U. hordei</i>	82,256	0,07	f g h
<i>Kaz. servazzii</i>	82,311	0,08	f g h
<i>S. cerevisiae</i>	82,326	0,07	f g h
<i>Kaz. naganishii</i>	82,419	0,10	g h i
<i>Z. bailii</i>	82,442	0,13	g h i
<i>T. delbrueckii</i>	82,462	0,07	g h i
<i>Met. reufkaufii</i>	82,466	0,10	g h i
<i>K. lactis</i>	82,486	0,07	g h i
<i>K. marxianus</i>	82,487	0,06	g h i
<i>P. membranifaciens</i>	82,534	0,05	h i
<i>C. ethanolica</i>	82,536	0,10	h i
<i>Saturnispora spp.</i>	82,678	0,10	i
<i>C. glabrata</i>	83,039	0,11	j
<i>Dek. anomala</i>	83,100	0,10	j k
<i>A. pullulans</i>	83,320	0,13	j k
<i>P. kluyveri</i>	83,340	0,06	j k
<i>P. manshurica</i>	83,401	0,08	k
<i>C. intermedia</i>	83,771	0,10	l
<i>P. kudriavzevii</i>	84,208	0,05	m
<i>Cl.lusitaniae</i>	84,708	0,07	n
<i>Met. fructicola</i>	84,805	0,16	n
<i>Metschnikowia sp.</i>	84,823	0,13	n
<i>Met. pulcherrima</i>	84,965	0,16	n
<i>P. fermentans</i>	85,302	0,04	o
<i>C. diversa</i>	85,498	0,13	o p
<i>P. Pastoris</i>	85,679	0,11	p
<i>Stn. diversa</i>	86,223	0,11	q

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

Tablo 4.9. My3f-My3r primeri ile elde edilen ortalama Tm değerleri

Maya Türü	Ortalama	S.H.	
<i>W. subpelliculosa</i>	77,719	0,22	a
<i>W. anomalus</i>	77,877	0,15	a
<i>S'copsis schoenii</i>	78,315	0,31	a b
<i>T. delbrueckii</i>	78,358	0,22	a b c
<i>Kr. fluxuum</i>	78,608	0,31	a b c
<i>Y. lipolytica</i>	78,843	0,31	b c d
<i>S'copsis vini</i>	78,986	0,34	b c d
<i>C. membranifaciens</i>	79,123	0,40	b c d
<i>Yamadazyma sp</i>	79,127	0,31	b c d
<i>C. zeylanoides</i>	79,311	0,18	c d e
<i>St. bacillaris</i>	79,673	0,31	d e f
<i>C. sake</i>	79,706	0,34	d e f
<i>C. intermedia</i>	79,815	0,31	d e f
<i>D. hansenii</i>	80,122	0,18	e f g
<i>Kaz. exigua</i>	80,302	0,40	f g h
<i>Sch.</i>	80,443	0,31	f g h
<i>S. cerevisiae</i>	80,508	0,23	f g h
<i>C. diversa</i>	80,527	0,40	f g h
<i>Z. bailii</i>	80,537	0,40	f g h
<i>H. guilliermondii</i>	80,558	0,31	f g h
<i>C. glabrata</i>	80,583	0,34	f g h
<i>H. uvarum</i>	80,682	0,18	f g h i
<i>Mey. guilliermondii</i>	81,096	0,22	g h i j
<i>Mey. caribbica</i>	81,150	0,40	h i j k
<i>K. lactis</i>	81,153	0,23	h i j k
<i>K. marxianus</i>	81,182	0,18	h i j k
<i>Kaz. servazzii</i>	81,306	0,24	h i j k
<i>Kaz. naganishii</i>	81,647	0,31	i j k l
<i>Cl.lusitaniae</i>	81,960	0,23	j k l m
<i>Dek. anomala</i>	82,007	0,31	j k l m
<i>P. Pastoris</i>	82,133	0,34	k l m
<i>U. hordei</i>	82,290	0,22	l m
<i>Met. reufkaufii</i>	82,337	0,31	l m
<i>A. pullulans</i>	82,387	0,40	l m
<i>Stn. diversa</i>	82,527	0,34	l m
<i>Met. fructicola</i>	82,785	0,49	m n
<i>P. kluyveri</i>	82,824	0,20	m n
<i>Saturnispora spp.</i>	82,922	0,31	m n
<i>Metschnikowia sp.</i>	83,558	0,40	n o
<i>P. kudriavzevii</i>	84,089	0,17	o p
<i>C. ethanolica</i>	84,114	0,31	o p
<i>P. membranifaciens</i>	84,115	0,15	o p
<i>P. manshurica</i>	84,294	0,24	o p
<i>P. fermentans</i>	84,462	0,13	o p
<i>Met. pulcherrima</i>	84,613	0,49	p

S.H:Standart hata

Farklı harf veya renklerle gösterilen ortalama değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05)

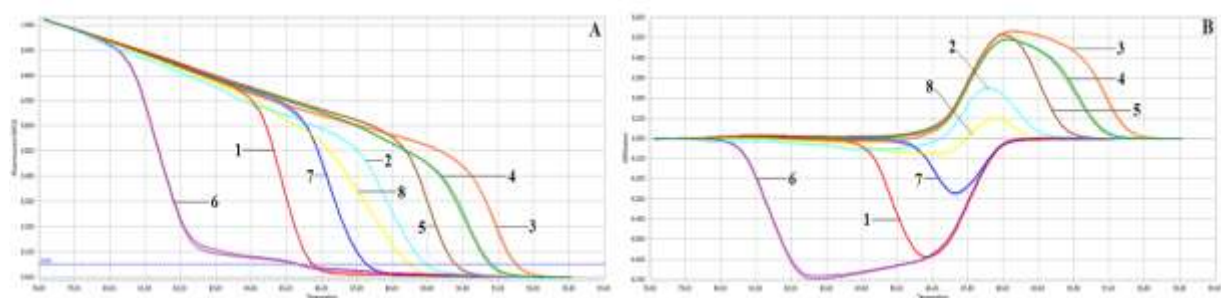
Tüm primerlere ait HRM eğrileri görsel olarak analiz edildiğinde Tm değerleri ile oldukça yakın ayrım karakteristikleri sergiledikleri gözlenmiştir. Cins seviyesinde yapılan değerlendirmelerde *Candida* cinsine ait analiz edilen tüm türlerin U1-U2, SSf1-SSr1 ve Esr1-Esr2 primerleri türe spesifik HRM profilleri ürettikleri tespit edilmiştir. Geriye kalan primerlerden, MnF-MnR ile *C. diversa*, *C. ethanolica*, *C. glabrata*, , *C. intermedia*, *C. lusitaniae* türlerininveNL1-LS2 primerleri ile de yalnızca *C. glabrata*, *C. intermedia* ve *C. lusitaniae* türlerinin cins içerisindeki ayrımı mümkün olmuştur (Şekil 4.2).

Pichia cinsi içerisinde en başarılı sonuçlar veren primer Fzg1-Fzg2 primerleri olmuştur. Ancak bu primer de *P. kluyveri* ve *P. manshurica* ayrımını gerçekleştirememiştir. Ancak bu türlerin ayrımı Esr1-Esr2, U1-U2 ve NL1-LS2 primerleri ile sağlanabilmiştir (Şekil 4.3).

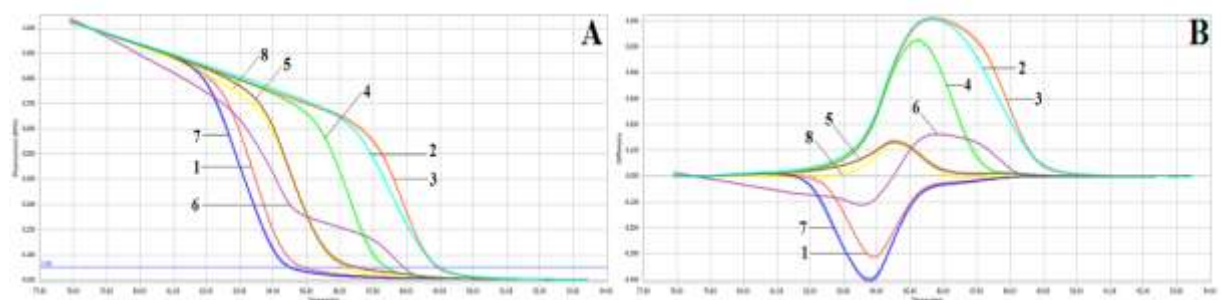
MFMAS sisteminin veri tabanına *Kazachstania* cinsi ait 3 tür *Kaz. exigua*, *Kaz. naganishii*, *Kaz. servazzii* tür dahil edilmiştir. Bunlar her tür için de yüksek çözünürlükte ayrım sağlayan primeler Fzg1-Fzg2, SS1f-SS1r, CH12f-CH12r ve My3f-My3r primerleri olmuştur (Şekil 4.4).

Kluyveromyces cinsine giren türlerden MFMAS veritabanına dahil edilen *K. lactis* ve *K. maxianus* türleri için NL1-LS2 ve Esr1-Esr2 primerlerinin ürettikleri HRM primerleri ayırt edici bulunmuştur (Şekil 4.5).

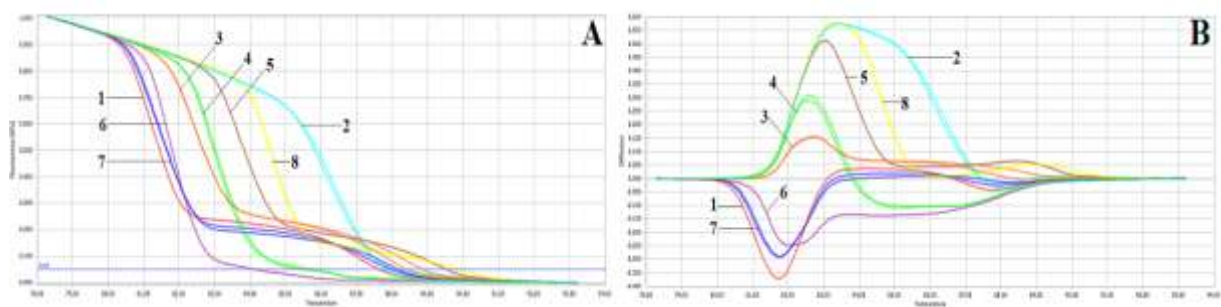
EsrF-EsrR primeri



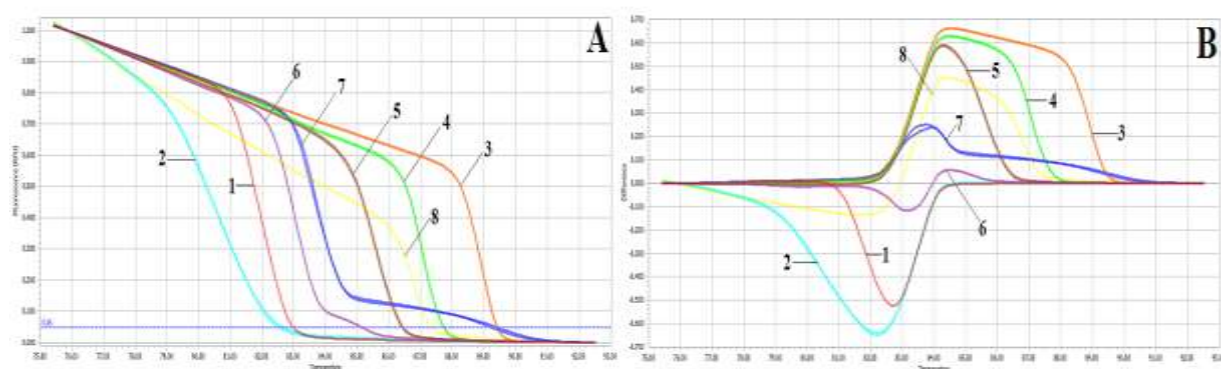
Fzg1-Fzg2 primeri



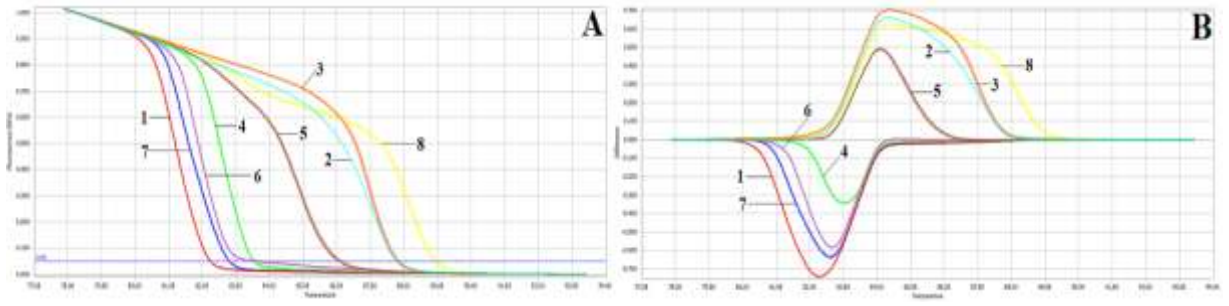
MnF-MnR primeri



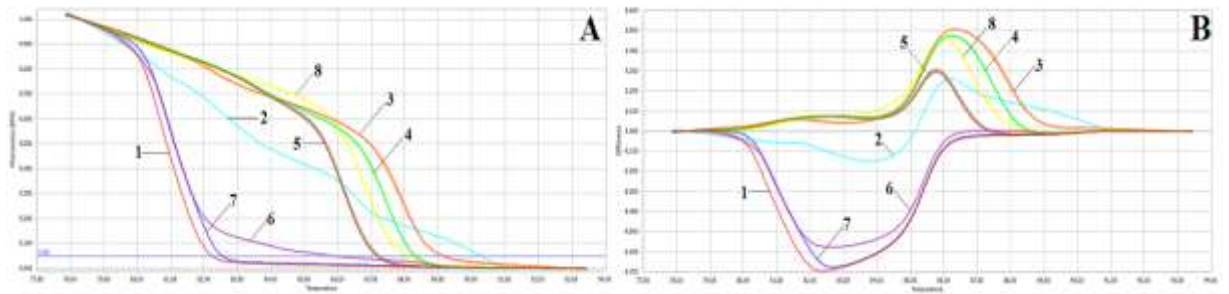
U1-U2 primeri



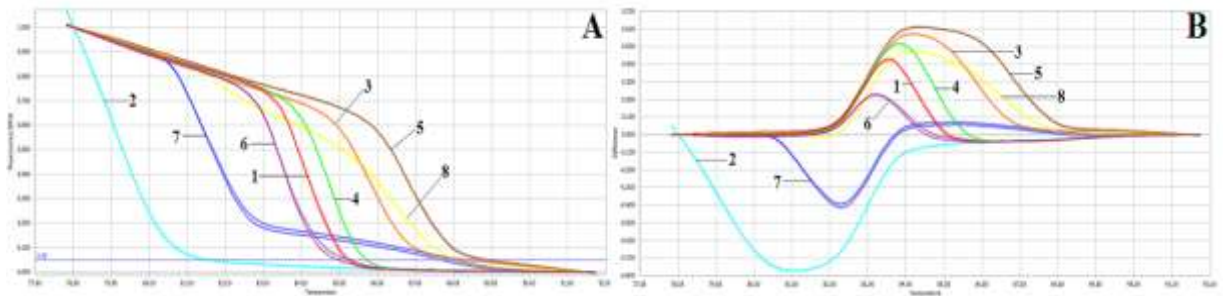
NL1-LS2 primeri



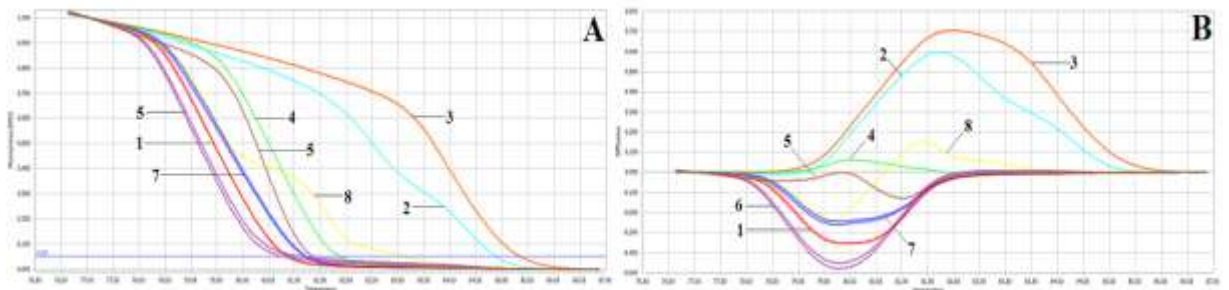
CH12f-CH12r primeri



SSf1-SSr1 primeri

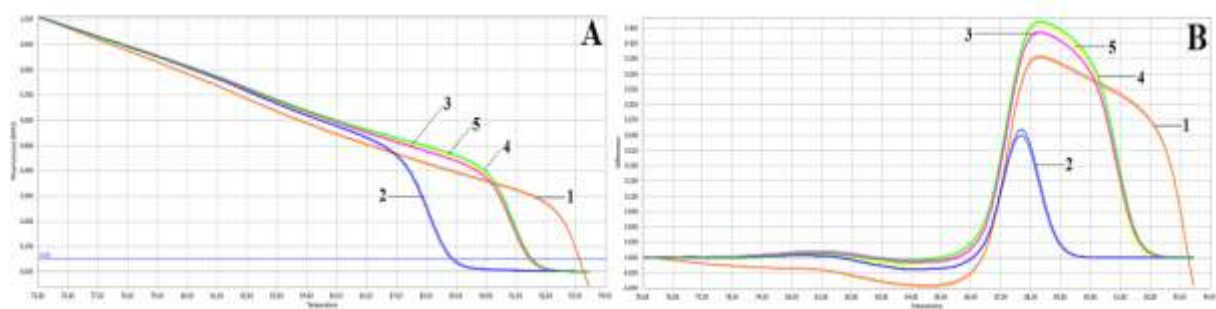


My3f-My3r primeri

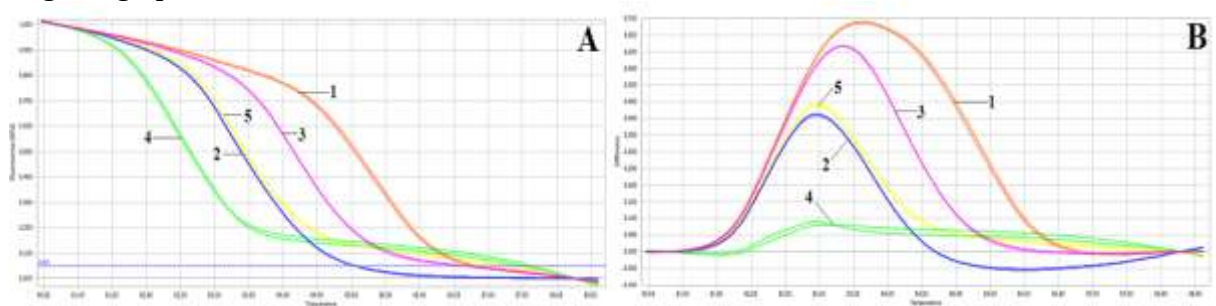


Şekil 4.2. *Candida* cinsi izolatların 8 farklı primer seti ile elde edilen HRM eğrileri (A): normalize erime eğrisi, (B):difference plot eğrisi, 1: *C. zeylanoides*, 2: *C. diversa*, 3: *C. ethanolica*, 4: *C. glabrata*, 5: *C. Intermedia*, 6: *C. membranifaciens*, 7: *C. sake*, 8: *C. lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*)

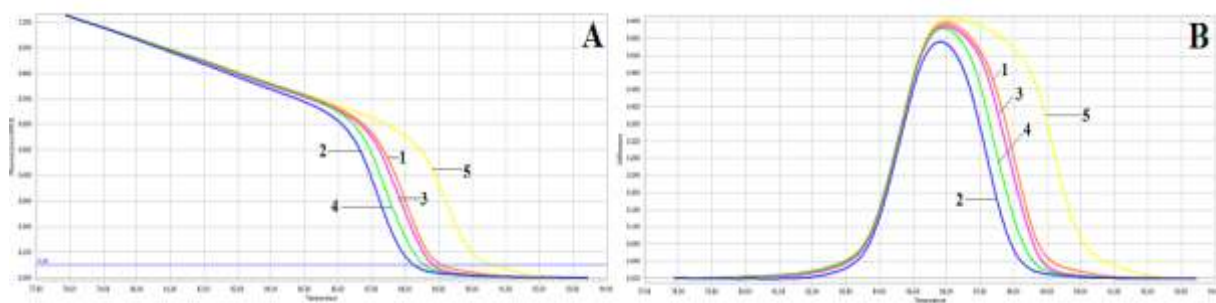
EsrF-EsrR primeri



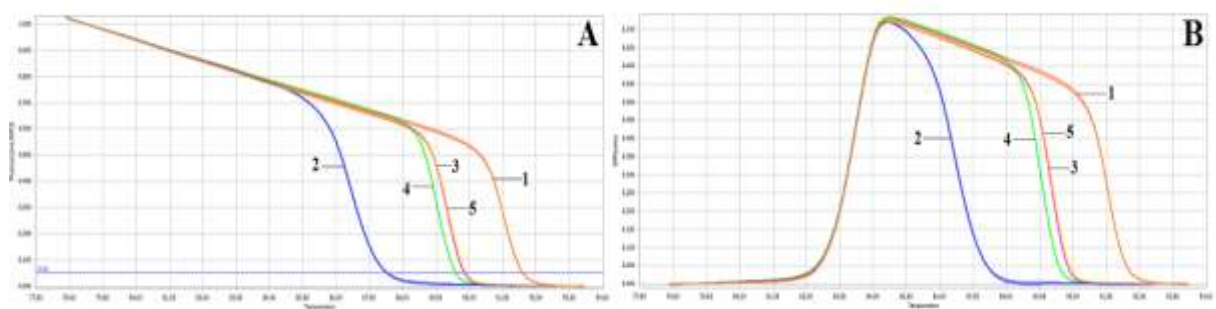
Fzg1-Fzg2 primeri



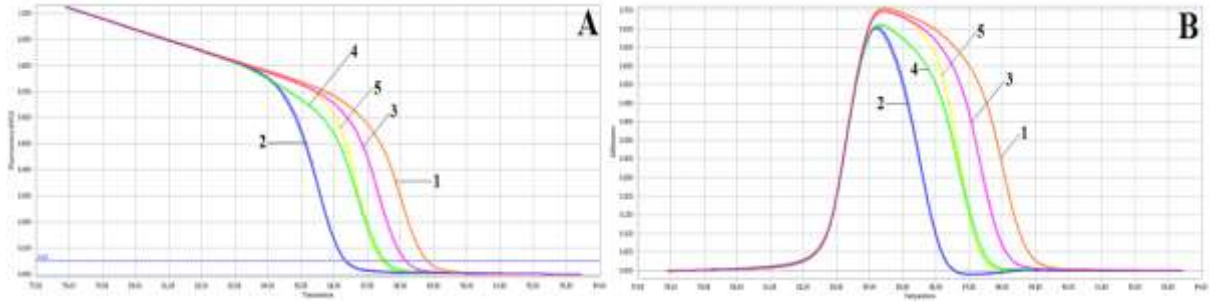
MnF-MnR primeri



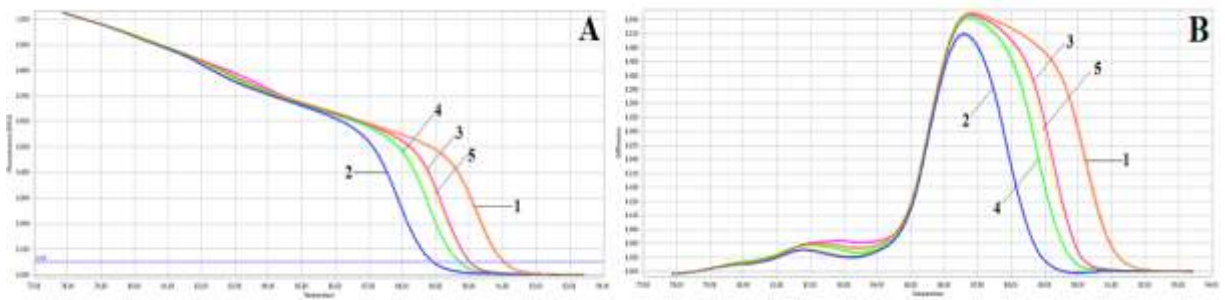
U1-U2 primeri



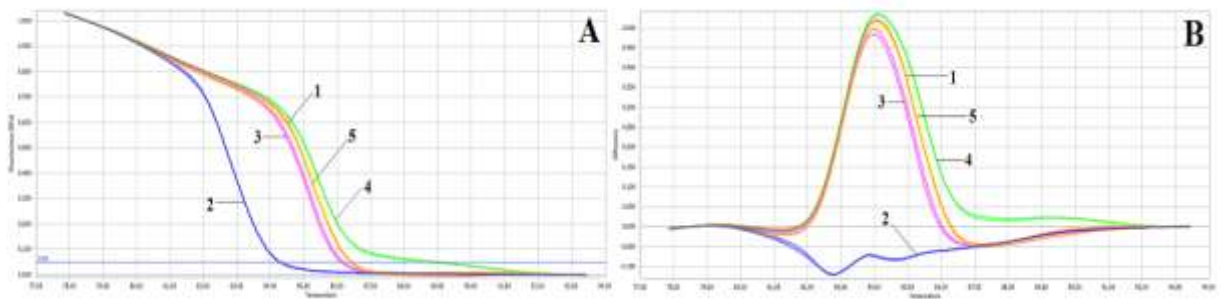
NL-LS primeri



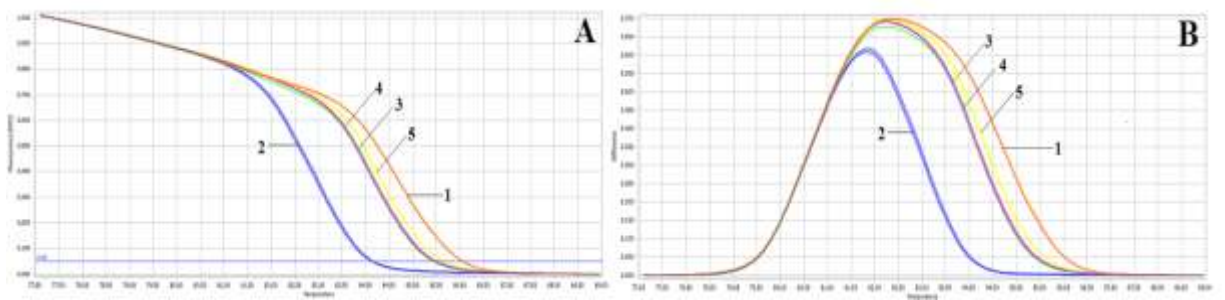
CH12f-CH12r primeri



SSf1-SSr1 primeri

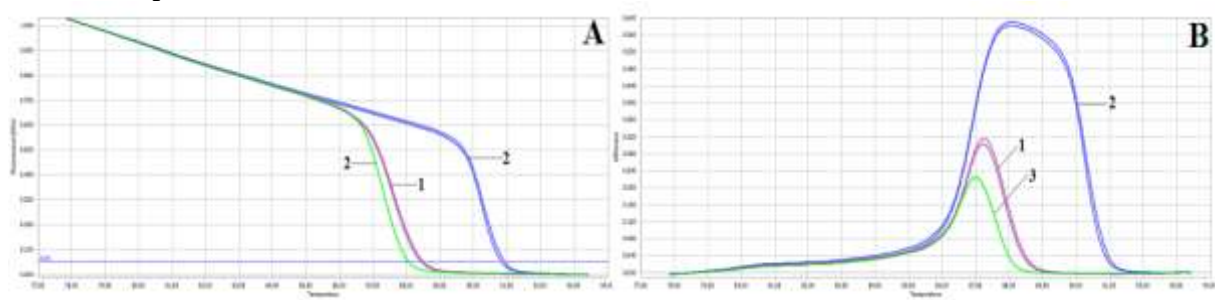


My3f-My3r primeri

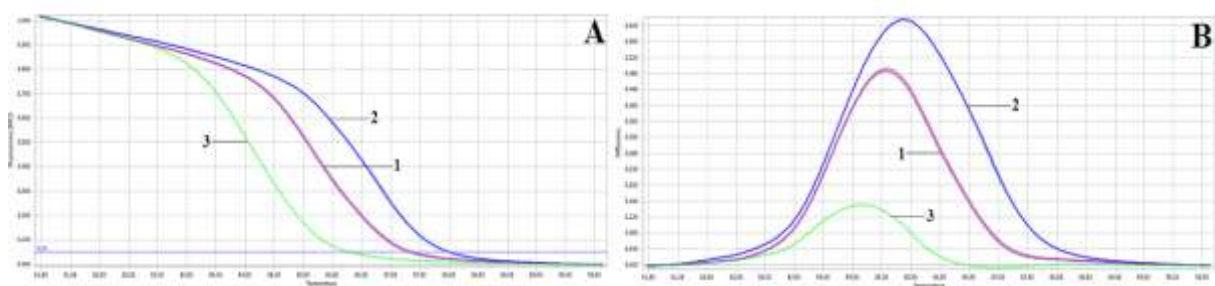


Şekil 4.3 *Pichia* cinsi izolatların 8 farklı primer seti ile elde edilen HRM eğrileri (A): normalize erime eğrisi, (B):difference plot eğrisi, 1: *P. fermentans*, 2: *P. kluyveri* ,3: *P. kudriavzevii*, 4: *P. membranifaciens*, , 5: *P. Manshurica*

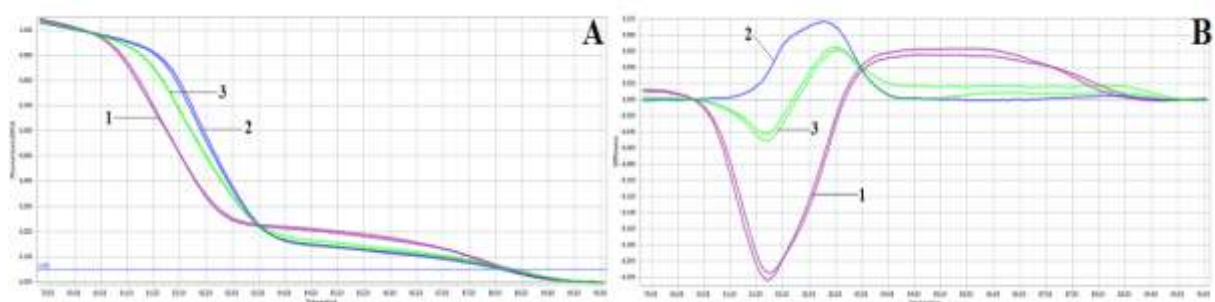
EsrF-EsrR primeri



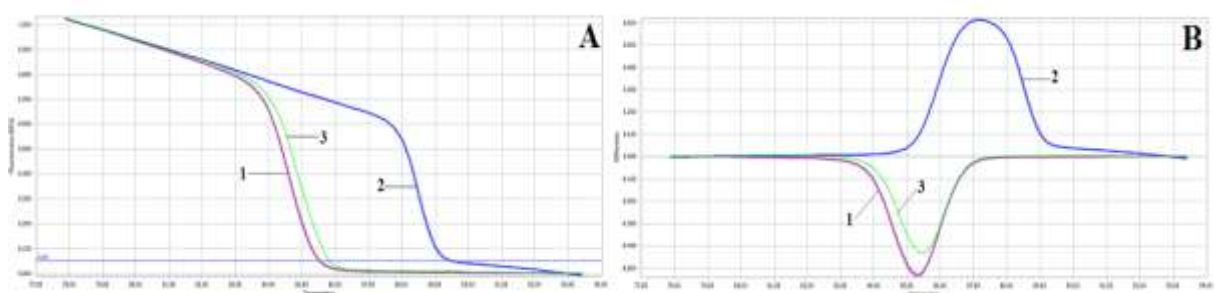
Fzg1-Fzg2 primeri



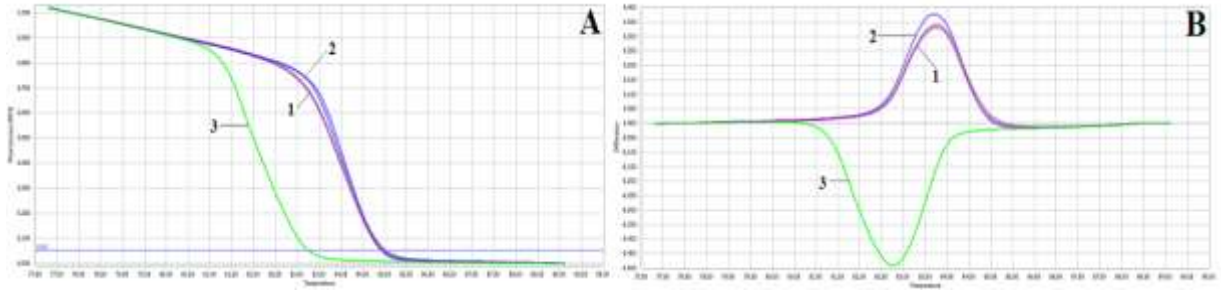
MnF-MnR primeri



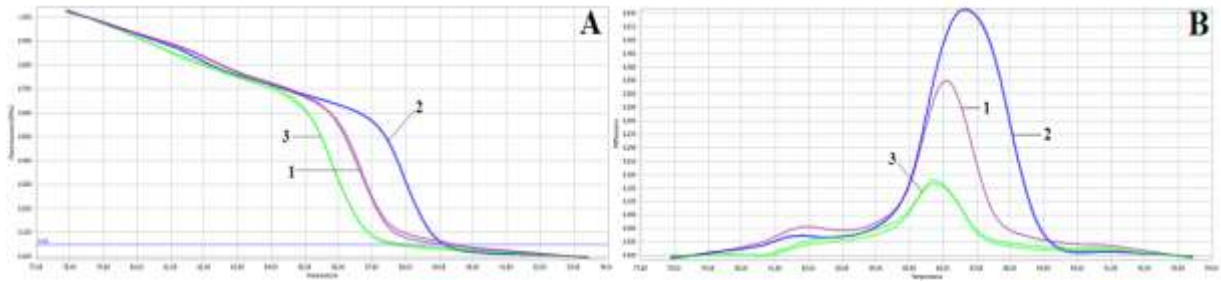
U1-U2 primeri



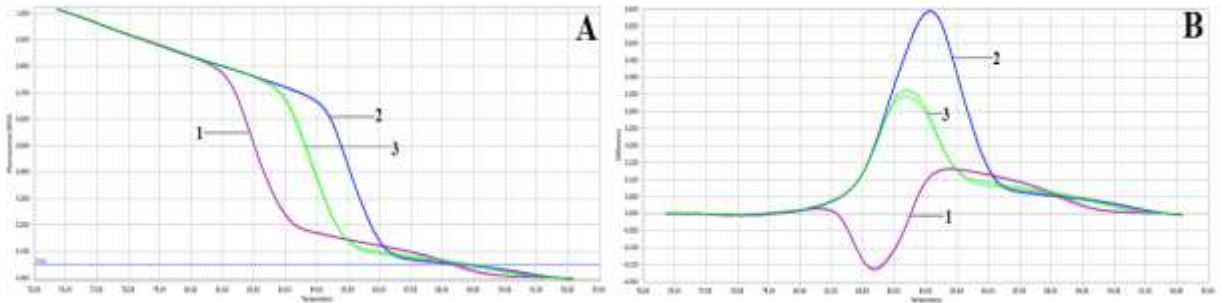
NL1-LS2 primeri



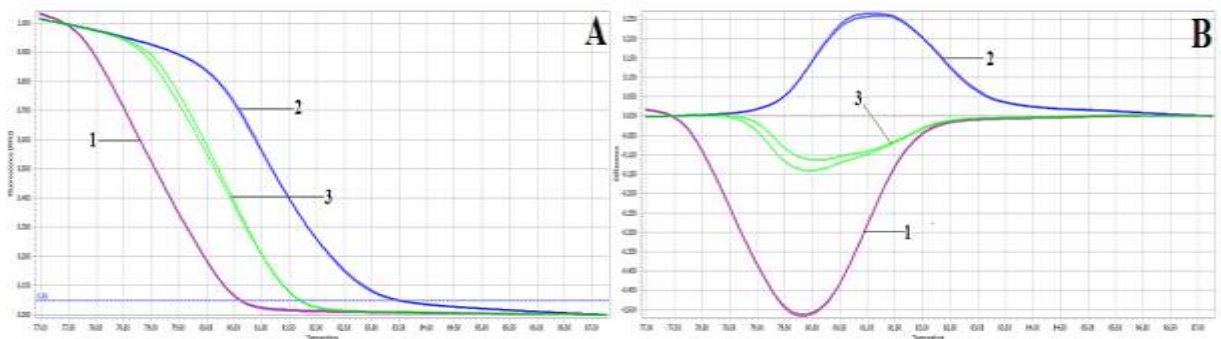
CH12f-CH12r primeri



SSf1-SSr1 primeri

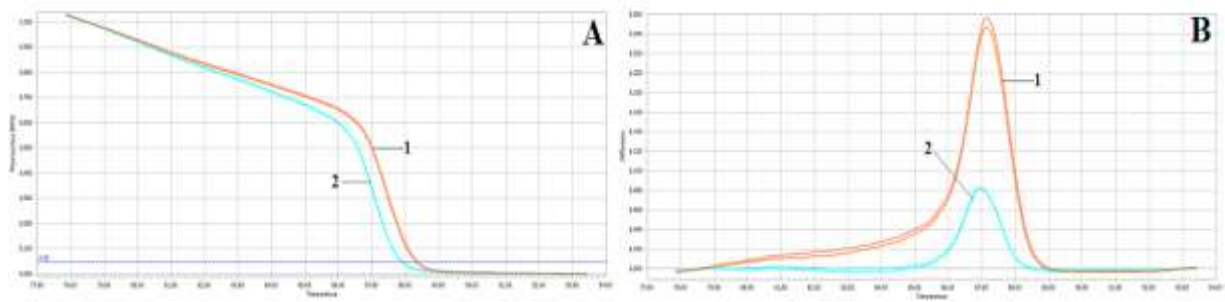


My3f-My3r primeri

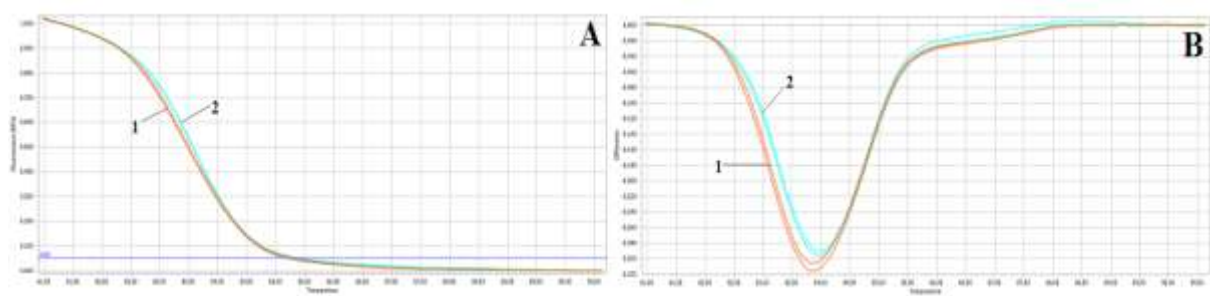


Şekil 4.4. *Kazachstania* cinsi izolatların 8 farklı primer seti ile elde edilen HRM eğrileri (A): normalize erime eğrisi, (B):difference plot eğrisi, 1: *Kaz. exigua*, 2: *Kaz. naganishii*, 3: *Kaz. servazzii*

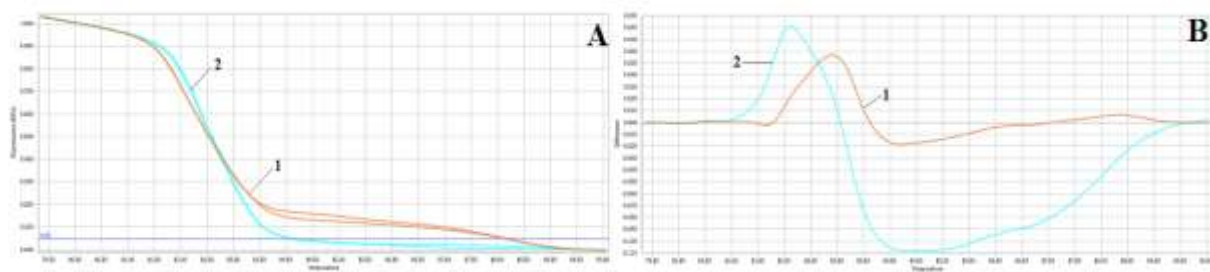
EsrF-EsrR primeri



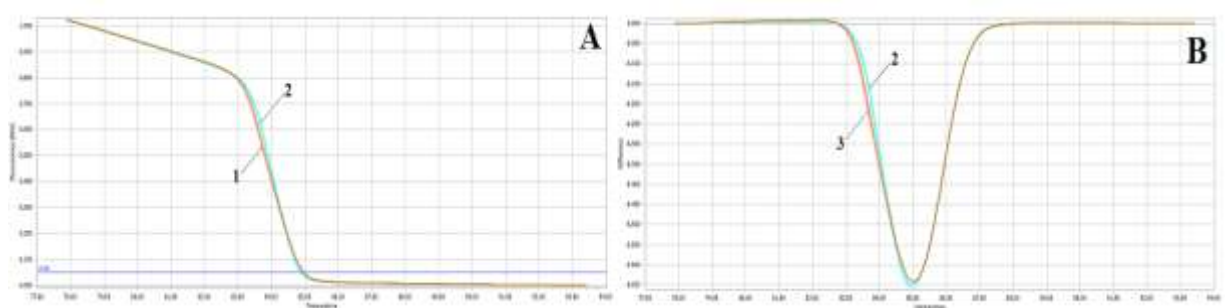
Fzg1-Fzg2 primeri



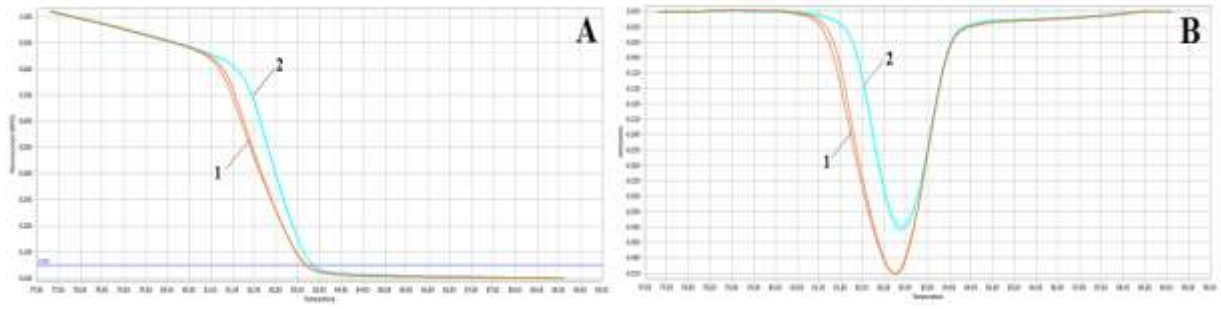
MnF-MnR primeri



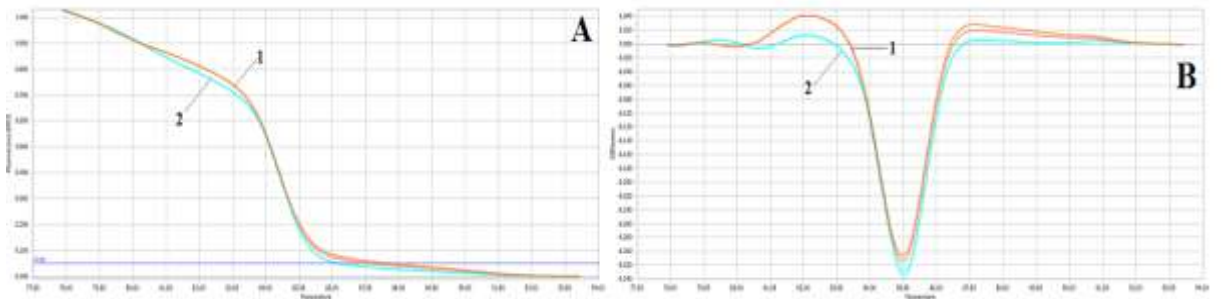
U1-U2 primeri



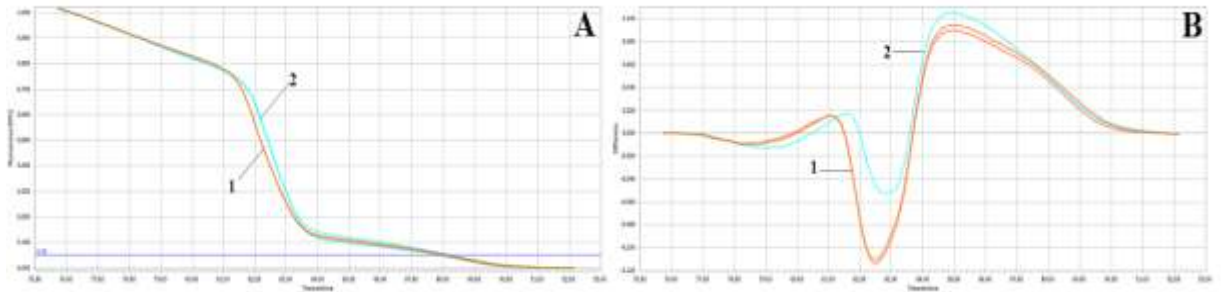
NL1-LS2 primeri



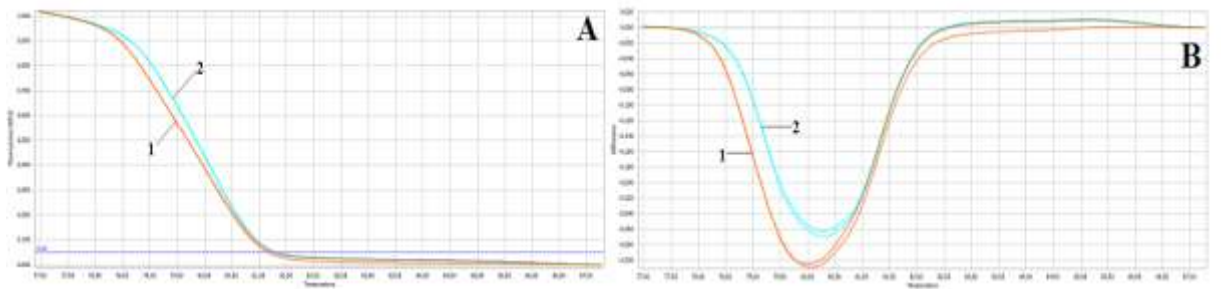
CH12f-CH12r primeri



SSf1-SSr1 primeri



My3f-My3r primeri



Şekil 4.5. *Kluyveromyces* cinsi izolatların NL-LS, CH12f-CH12r, SSf1-SSr1, My3f-My3r primerleri ile elde edilen HRM eğrileri (A) normalize erime eğrisi, (B) difference plot eğrisi, 1: *K. lactis*, 2: *K. marxianus*

4.3. MFMASSistemine ait Bilgisayar Yazılımının Test Edilmesi

Proje kapsamında geliştirilen maya tanımlama sistemi, HRM ve Tm verilerinin depolanması, görselleştirilmesi ve analiz edilmesi amacıyla geliştirilmiş bir bilgisayar yazılımı ile desteklenmiştir. Geliştirilen bu yazılım, elde edilen HRM ve Tm verilerini referans türle karşılaştıran bir ön işlemde geçirildikten sonra, verilerin görselleştirmesini veri tabanına kayıt edilmesini ve kayıtlı verilerin birbirleriyle karşılaştırılmasını gerçekleştirmektedir.

Çalışma kapsamına dahil edilen tüm maya suşlarına ait HRM ve Tm verileri veritabanına cins, tür ve strain bilgilerini içerecek şekilde kayıt edildikten sonra sistemin başarısı her bir maya türü ayrı ayrı analiz edilerek test edilmiştir.

MFMASS sistemi, analiz edilen her bir maya türünün 8 farklı primer için elde HRM profilleri veritabanında kayıtlı türlerin verileri ile karşılaştırmış ve benzeşme oranına göre her bir primer için olasılıkları sıralamıştır. Daha sonra her bir primer için elde edilen olasılıkları skorlayarak analiz edilen türün tespitini gerçekleştirmiştir. (Tablo 4.10).

Benzer değerlendirme yöntemi sayısal datalar üzerinden Tm değerleri için uygulanmış ve analiz edilen türün veritabanındaki karşılığı bulunmuştur. Ayrıca Tm değerleri için tüm primer setleri ile elde edilen değerler analiz edilerek maya türlerinin arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren bir dendogram oluşturulmuştur (Şekil 4.6). Oluşturulan dendogramda farklı cinslerin ve bu cinsler içerisindeki türlerin birbirlerinden belirgin bir şekilde ayrıldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.10. Her bir maya türünün 8 farklı DNA bölgesinin HRM analizine ait verilerinin, veritabanında sorgulanması ile elde edilen sonuçlar

Kod	MAYA TÜRLERİ								Sonuç
	EsrF-EsrR	Fzg1-Fzg2	CH12f-CH12r	u1-u2	SSf1-SSr1	nl-ls	My3f-My3r	MnF-MnR	
'T31'	<i>A. pullulans</i> <i>C. intermedia</i> <i>Saturnispora spp.</i>	<i>A. pullulans</i> <i>Dek. anomala</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. pastoris</i> <i>U. hordei</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>A. pullulans</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. fructicola</i> <i>Met. sp.</i>	<i>A. pullulans</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>P. kluyveri</i> <i>U. hordei</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>A. pullulans</i> <i>C. sake</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>A. pullulans</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>Z. rouxii</i> <i>A. pullulans</i> <i>C. glabrata</i> <i>Dek. anomala</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i> <i>P. manshurica</i>	<i>A. pullulans</i>
'1'	<i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>C. ethanolica</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. bispurus</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>C. ethanolica</i>
'M190'	<i>A. pullulans</i> <i>C. glabrata</i> <i>Saturnispora spp.</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Kaz. exigua</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>Kaz. exigua</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>Z. lentus</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>C. glabrata</i> <i>K. marxianus</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Z. bailii</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i> <i>P. manshurica</i>	<i>C. glabrata</i>

					<i>Z. bailii</i>				
'E2'	<i>C. intermedia</i> <i>Z. bisporus</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Z. bailii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Kaz. servazzii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Kaz. servazzii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>C. membranifaciens</i>	<i>C. diversa</i> <i>C. intermedia</i> <i>Kaz. naganishii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>Kaz. servazzii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Met. pulcherrima</i>	<i>C. intermedia</i>
'M53'	<i>Kr. fluxuum</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. membranifaciens</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>C. sake</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Met. sp.</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>K. lactis</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>St. bacillaris</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. exigua</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Z. lentus</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. uvarum</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. membranifaciens</i>
'P13'	<i>C. sake</i>	<i>C. sake</i>		<i>Dek. bruxellensis</i> <i>C. sake</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. fructicola</i>	<i>C. sake</i> <i>S'copsis schoenii</i>	<i>A. pullulans</i> <i>C. sake</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. sake</i> <i>D. hansenii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>C. sake</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>C. sake</i>
68'	<i>Cl.lusitaniae</i>	<i>C. diversa</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	

	<i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>U. hordei</i> <i>C. diversa</i> <i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Sch. pombe</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. fructicola</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Sch. pombe</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>U. hordei</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>C. tropicalis</i>
'E10'	<i>C. zeylanoides</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Sch. pombe</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. diversa</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. zeylanoides</i>
'K93'	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>C. diversa</i> <i>S. bouldardii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Z. bailii</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>Kaz. exigua</i>		<i>Cl.lusitaniae</i> <i>D. hansenii</i>	<i>Cl.lusitaniae</i>	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>Kaz. servazzii</i>	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>P. fermentans</i> <i>Stn. diversa</i>	<i>Cl.lusitaniae</i>
'E1'	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Kr. fluxuum</i>	<i>C. sake</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i>	<i>S. bouldardii</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i>	<i>Z. lentus</i> <i>C. glabrata</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i>	<i>A. pullulans</i> <i>C. sake</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i>	<i>D. hansenii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i>	<i>D. hansenii</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>D. hansenii</i>

		<i>S'copsis vini</i>	<i>P. pastoris</i>		<i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i>		
'166'	<i>Dek. anomala</i> <i>Z. bailii</i>	<i>A. pullulans</i> <i>Dek. anomala</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. pastoris</i> <i>U. hordei</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>Dek. anomala</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>Dek. anomala</i>	<i>D. hansenii</i> <i>Dek. anomala</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>U. hordei</i>	<i>Dek. anomala</i>	<i>Dek. anomala</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>Dek. anomala</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i> <i>P. manshurica</i>	<i>Dek. anomala</i>
'Y-12961'	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S. boulardii</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>S. boulardii</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>Z. rouxii</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>D. hansenii</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>Kaz. exigua</i> <i>Kaz. naganishii</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>Z. rouxii</i> <i>C. glabrata</i> <i>Met. pulcherrima</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>
'M157'	<i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i>	<i>C. intermedia</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. uvarum</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>Z. bisporus</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>H. guilliermondii</i> <i>H. uvarum</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>S'copsis schoenii</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. exigua</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Yamadazyma sp</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i>	<i>H. guilliermondii</i>

								<i>Z. bailii</i>	
'A52'	<i>H. guilliermondii</i>	<i>C. intermedia</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>C. membranifaciens</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>H. uvarum</i>
	<i>H. opuntiae</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>P. membranifaciens</i>	
	<i>H. uvarum</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. opuntiae</i>		<i>H. opuntiae</i>	<i>H. uvarum</i>		
		<i>H. uvarum</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>H. uvarum</i>		<i>H. uvarum</i>	<i>Kaz. servazzii</i>		
		<i>Kaz. servazzii</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i>			<i>S'copsis schoenii</i>	<i>S'copsis vini</i>		
		<i>Met. pulcherrima</i>	<i>St. bacillaris</i>				<i>Yamadazyma sp</i>		
		<i>Wic. anomalus</i>							
'Y-1626'	<i>H. opuntiae</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>H. valbyensis</i>
	<i>H. uvarum</i>			<i>Z. bisporus</i>	<i>Met. pulcherrima</i>		<i>Cl. lusitaniae</i>	<i>Z. bisporus</i>	
	<i>H. valbyensis</i>			<i>D. hansenii</i>			<i>Kaz. servazzii</i>	<i>D. hansenii</i>	
				<i>H. guilliermondii</i>			<i>Z. bailii</i>	<i>H. opuntiae</i>	
				<i>S'copsis vini</i>				<i>H. uvarum</i>	
				<i>Sch. pseudopoly.</i>				<i>K. marxianus</i>	
				<i>Wic. subpelliculosa</i>				<i>S. cerevisiae</i>	
								<i>T. delbrueckii</i>	
								<i>U. hordei</i>	
								<i>Z. bailii</i>	
'E22'	<i>Kaz. exigua</i>	<i>Sch. pombe</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>Kaz. exigua</i>	<i>Kaz. exigua</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>Kaz. exigua</i>
	<i>Kaz. servazzii</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>Cl. lusitaniae</i>	<i>Kaz. servazzii</i>	<i>K. lactis</i>	<i>Kaz. exigua</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>D. hansenii</i>	
		<i>Kaz. exigua</i>	<i>Kaz. exigua</i>	<i>K. lactis</i>		<i>Kaz. naganishii</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. uvarum</i>	
		<i>T. delbrueckii</i>		<i>Met. pulcherrima</i>			<i>Kaz. exigua</i>	<i>Kaz. exigua</i>	
				<i>Mey. guilliermondii</i>			<i>Kaz. servazzii</i>	<i>S'copsis schoenii</i>	
				<i>T. delbrueckii</i>			<i>S'copsis vini</i>	<i>T. delbrueckii</i>	
							<i>Yamadazyma sp</i>		
							<i>Y. lipolytica</i>		
'1'	<i>Kaz. naganishii</i>	<i>Kaz. naganishii</i>	<i>Kaz. naganishii</i>	<i>C. ethanolica</i>	<i>Kaz. naganishii</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>Kaz. naganishii</i>	<i>H. valbyensis</i>	

		<i>Saturnispora</i>		<i>Kaz. naganishii</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i> <i>U. hordei</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Kaz. exigua</i> <i>Kaz. naganishii</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Kaz. naganishii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>Saturnispora</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i>	<i>K. naganishi</i>
'E15'	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. sp.</i>	<i>C. sake</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. sp.</i>	<i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i>	<i>K. marxianus</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>Kaz. naganishii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>Saturnispora</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>K. marxianus</i>
'21'	<i>Kr. fluxuum</i>	<i>D. hansenii</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S'copsis vini</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i>	<i>Kr. fluxuum</i>	<i>Kr. fluxuum</i>	<i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. glabrata</i> <i>K. marxianus</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Met. pulcherrima</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>C. sake</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. exigua</i> <i>Kr. fluxuum</i>	<i>Kr. fluxuum</i>

						<i>U. hordei</i>		<i>Mey. caribbica</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	
'M71'	<i>Met. sp.</i>	<i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>Met. sp.</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>Met. sp.</i>	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>P. pastoris</i> <i>Stn. diversa</i> <i>U. hordei</i>	<i>Met. sp.</i>	<i>Metschnikowia spp.</i>
'CY1'	<i>Mey. caribbica</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. guilliermondii</i>	<i>Kr. fluxuum</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S'copsis vini</i>	<i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>P. pastoris</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Z. bailii</i>	<i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>U. hordei</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>K. lactis</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>St. bacillaris</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>C. sake</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>Mey. caribbica</i>
'A58'	<i>C. zeylanoides</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i>	<i>Kr. fluxuum</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. guilliermondii</i>	<i>Kaz. exigua</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Z. bailii</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>P. fermentans</i> <i>U. hordei</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Mey. guilliermondii</i>

'M73'	<i>Met. fructicola</i>	<i>Met. fructicola</i>	<i>Met. fructicola</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. fructicola</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Met. fructicola</i> <i>P. pastoris</i>	<i>Met. fructicola</i>	<i>Met. fructicola</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>P. pastoris</i> <i>Stn. diversa</i> <i>U. hordei</i>	<i>Met. fructicola</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Met. fructicola</i>
'M62'	<i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S'copsis schoenii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>St. bacillaris</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>P. pastoris</i>	<i>Kaz. exigua</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>C. sake</i> <i>Met. pulcherrima</i>	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. fructicola</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>P. pastoris</i> <i>Stn. diversa</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>Z. bisporus</i> <i>H. uvarum</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>Met. pulcherrima</i>
'M31'	<i>P. kluyveri</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>S. bouldarii</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>A. pullulans</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>P. kluyveri</i> <i>U. hordei</i>	<i>S. bouldarii</i> <i>Sch. pombe</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>P. kluyveri</i> <i>P. pastoris</i>	<i>S. bouldarii</i> <i>Sch. pombe</i> <i>Met. sp.</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>A. pullulans</i> <i>C. glabrata</i> <i>Dek. anomala</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i> <i>P. manshurica</i>	<i>P. kluyveri</i>
'A11'	<i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i>	<i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i>	<i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>C. glabrata</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i>	<i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kudriavzevii</i>	<i>P. kudriavzevii</i>

					<i>Mey. guilliermondii</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Z. bailii</i>		<i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>		
'A64'	<i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>P. manshurica</i>	<i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>Z. lentus</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i> <i>P. manshurica</i>	<i>P. manshurica</i>
E35'		<i>C. ethanolica</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i>	<i>P. fermentans</i>		<i>C. glabrata</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>Cl. lusitaniae</i> <i>P. fermentans</i>	<i>Z. lentus</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>		<i>P. fermentans</i>

					<i>Z. bailii</i>				
'A18'	<i>C. ethanolica</i>	<i>C. ethanolica</i>	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. ethanolica</i>	<i>P. manshurica</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>P. membranifaciens</i>
	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>P. fermentans</i>	<i>P. manshurica</i>	<i>P. manshurica</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>H. valbyensis</i>	
	<i>P. manshurica</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>Dek. anomala</i>		<i>P. kudriavzevii</i>	<i>C. ethanolica</i>	
	<i>P. membranifaciens</i>		<i>C. sake</i>		<i>P. membranifaciens</i>		<i>P. membranifaciens</i>	<i>Kaz. servazzii</i>	
					<i>Sch. pseudopoly.</i>			<i>Met. pulcherrima</i>	
								<i>P. membranifaciens</i>	
								<i>Saturnispora</i>	
								<i>T.delbrueckii</i>	
'PP1'	<i>P. pastoris</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>D. hansenii</i>		<i>P. pastoris</i>	<i>Dek. anomala</i>	<i>Kaz. servazzii</i>	<i>Cl.lusitaniae</i>	<i>P. pastoris</i>
		<i>Dek. anomala</i>	<i>Met. pulcherrima</i>			<i>P. kluyveri</i>		<i>P. fermentans</i>	
		<i>Met. pulcherrima</i>	<i>Mey. caribbica</i>			<i>P. pastoris</i>		<i>P. pastoris</i>	
		<i>P. pastoris</i>	<i>P. pastoris</i>						
		<i>U. hordei</i>							
'Y-2510'	<i>C. glabrata</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. diversa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. diversa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
	<i>Saturnispora</i>	<i>Z. lentus</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	
	<i>R. mucilaginosa</i>		<i>A. pullulans</i>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>Mey. guilliermondii</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>C. ethanolica</i>	<i>D. hansenii</i>	
	<i>Z. lentus</i>		<i>Kr. fluxuum</i>	<i>Kr. fluxuum</i>	<i>St. bacillaris</i>		<i>P. kudriavzevii</i>	<i>Mey. guilliermondii</i>	
			<i>T.delbrueckii</i>	<i>St. bacillaris</i>	<i>Wic. anomalus</i>		<i>P. manshurica</i>	<i>Wic. anomalus</i>	
							<i>P. membranifaciens</i>	<i>Yamadazyma sp</i>	
SSb	<i>Cl.lusitaniae</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>S.bouldarii</i>
	<i>K. marxianus</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>Kr. fluxuum</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>Sch. pombe</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>Sch. pombe</i>	<i>D. hansenii</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. kluyveri</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>K. lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Cl.lusitaniae</i>	<i>H. opuntiae</i>	
	<i>T.delbrueckii</i>		<i>T.delbrueckii</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>H. uvarum</i>	
	<i>U. hordei</i>		<i>U. hordei</i>	<i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Met. pulcherrima</i>		<i>Met. sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>Dek. bruxellensis</i>				<i>Met. sp.</i>		<i>P. kluyveri</i>	<i>S'copsis vini</i>	
	<i>S. bouldarii</i>				<i>P. kluyveri</i>		<i>Saturnispora</i>		

					<i>S. cerevisiae</i>		<i>U. hordei</i>		
'M37'	<i>Cl.lusitaniae</i>	<i>C. intermedia</i>	<i>Dek. anomala</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>Met. sp.</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	<i>K. marxianus</i>	<i>Cl.lusitaniae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>Kaz. servazzii</i>	<i>S. bouldarii</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Kaz. servazzii</i>		<i>C. membranifaciens</i>		<i>Z. rouxii</i>	<i>Mey. caribbica</i>	<i>D. hansenii</i>	
	<i>T.delbrueckii</i>	<i>Met. pulcherrima</i>		<i>Kaz. servazzii</i>		<i>Met. pulcherrima</i>	<i>Mey. guilliermondii</i>	<i>H. opuntiae</i>	
	<i>U. hordei</i>	<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. uvarum</i>	
	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>St. bacillaris</i>		<i>S'copsis schoenii</i>		<i>Z. bailii</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>S. bouldarii</i>	<i>Z. bailii</i>		<i>Wic. anomalus</i>			<i>Z. bailii</i>	<i>S'copsis vini</i>	
								<i>U. hordei</i>	
'G1'	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>S'copsis schoenii</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>C. sake</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>Kaz. servazzii</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>S'copsis schoenii</i>
	<i>Mey. guilliermondii</i>		<i>S'copsis schoenii</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>S'copsis schoenii</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>Kr. fluxuum</i>	<i>D. hansenii</i>	
	<i>S'copsis schoenii</i>			<i>Z. rouxii</i>		<i>S'copsis schoenii</i>	<i>S'copsis schoenii</i>	<i>H. guilliermondii</i>	
				<i>C. membranifaciens</i>			<i>T.delbrueckii</i>	<i>H. uvarum</i>	
				<i>Kaz. servazzii</i>				<i>K. marxianus</i>	
				<i>S'copsis schoenii</i>				<i>S. cerevisiae</i>	
				<i>Wic. anomalus</i>				<i>S'copsis schoenii</i>	
								<i>T.delbrueckii</i>	
								<i>U. hordei</i>	
								<i>Z. bailii</i>	
'M134'	<i>S'copsis vini</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>S'copsis vini</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>Met. pulcherrima</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>H. guilliermondii</i>	<i>S. bouldarii</i>	<i>S'copsis vini</i>
		<i>Kr. fluxuum</i>		<i>Z. bisporus</i>	<i>S'copsis vini</i>	<i>S'copsis vini</i>	<i>H. opuntiae</i>	<i>D. hansenii</i>	
		<i>Met. fructicola</i>		<i>D. hansenii</i>			<i>H. uvarum</i>	<i>H. opuntiae</i>	
		<i>S'copsis vini</i>		<i>H. guilliermondii</i>			<i>Kaz. exigua</i>	<i>H. uvarum</i>	
		<i>Yamadazyma sp</i>		<i>S'copsis vini</i>			<i>Kaz. servazzii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
				<i>Sch. pseudopoly.</i>			<i>S'copsis vini</i>	<i>S'copsis vini</i>	
				<i>Wic. subpelliculosa</i>			<i>Yamadazyma sp</i>		
				<i>Yamadazyma sp</i>			<i>Y. lipolytica</i>		
'04'	<i>A. pullulans</i>	<i>Kaz. naganishii</i>	<i>Saturnispora</i>	<i>P. fermentans</i>	<i>Saturnispora</i>	<i>Saturnispora</i>	<i>Met. sp.</i>	<i>H. valbyensis</i>	

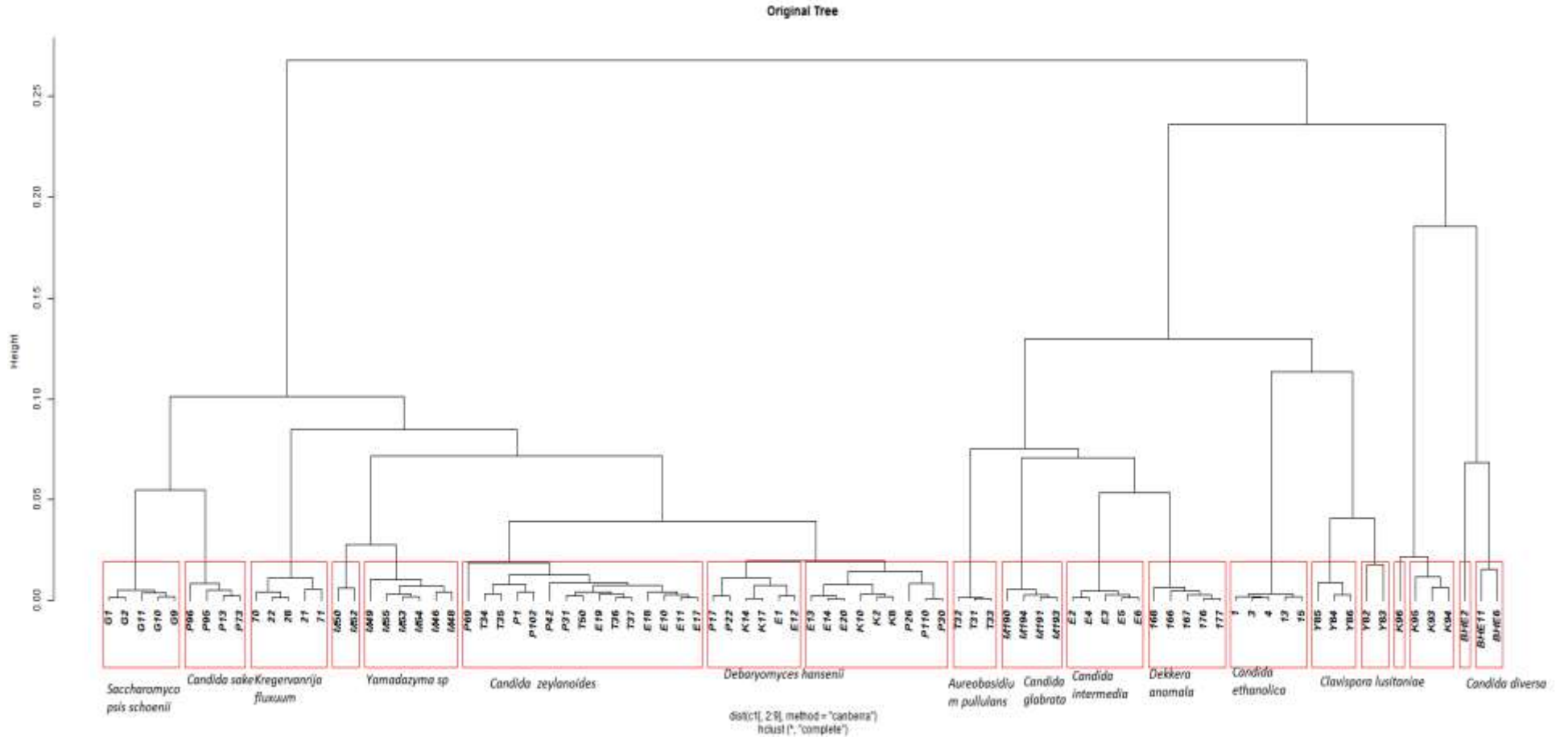
	<i>C. glabrata</i> <i>Saturnispora</i> spp. <i>R. mucilaginos</i>	<i>Saturnispora</i>		<i>Saturnispora</i>			<i>P. kluyveri</i> <i>Saturnispora</i>	<i>C. ethanolica</i> <i>Kaz. naganishii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>Saturnispora</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>U. hordei</i>	<i>Saturnispora</i> spp.
'BH11'	<i>Stn. diversa</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>P. fermentans</i> <i>P. kluyveri</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>Stn. diversa</i>		<i>Stn. diversa</i>	<i>Stn. diversa</i>	<i>Stn. diversa</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Cl. lusitaniae</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>P. pastoris</i> <i>Stn. diversa</i> <i>U. hordei</i>	<i>Cl. lusitaniae</i> <i>P. fermentans</i> <i>Stn. diversa</i>	<i>Stn. diversa</i>
'Y-9'	<i>Sch. pombe</i>	<i>Sch. pombe</i> <i>T. delbrueckii</i>	<i>Sch. pombe</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Wic. subpelliculosa</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>Sch. pombe</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. boulardii</i> <i>Sch. pombe</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. kluyveri</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>Sch. pombe</i> <i>Met. pulcherrima</i>	<i>S. boulardii</i> <i>Sch. pombe</i> <i>Cl. lusitaniae</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>P. kluyveri</i> <i>Saturnispora</i> <i>U. hordei</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>Sch. pombe</i> <i>Z. rouxii</i> <i>A. pullulans</i> <i>C. glabrata</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>Sch. pombe</i>
'A23'	<i>C. zeylanoides</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>Met. pulcherrima</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>Z. bisporus</i> <i>D. hansenii</i>	<i>Dek. anomala</i> <i>Kaz. naganishii</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>A. pullulans</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>C. sake</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i>	<i>C. sake</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i>

		<i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>H. guilliermondii</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. subpelliculosa</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Sch. pseudopoly.</i> <i>U. hordei</i>	<i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>St. bacillaris</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Mey. guilliermondii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Sch. pseudopoly.</i>	<i>H. uvarum</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	
'M41'	<i>St. bacillaris</i>	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Z. bailii</i>	<i>H. opuntiae</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>C. diversa</i> <i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>St. bacillaris</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. sake</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>C. diversa</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>St. bacillaris</i>
'M169'	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>C. diversa</i> <i>S. bouldardii</i>	<i>Dek. anomala</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>S. bouldardii</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Met. sp.</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>Met. sp.</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>St. bacillaris</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>Z. bisporus</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>T.delbrueckii</i>
'K23'	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i>	<i>A. pullulans</i> <i>Dek. anomala</i> <i>H. guilliermondii</i>	<i>S. bouldardii</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>U. hordei</i>	<i>Z. lentus</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. zeylanoides</i>	<i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>Z. rouxii</i>	<i>Cl.lusitaniae</i> <i>Kaz. servazzii</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. naganishii</i>	

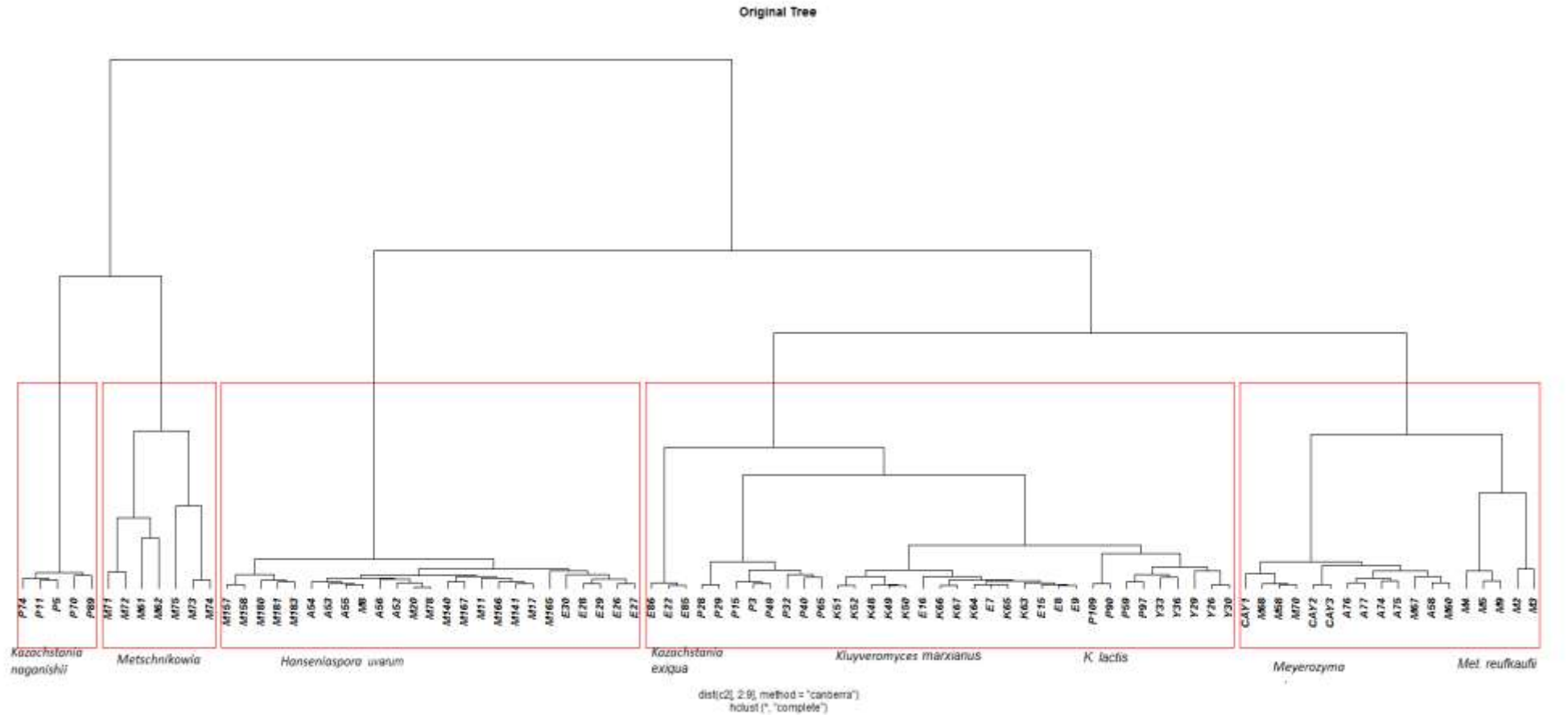
	<i>U. hordei</i> <i>C. diversa</i> <i>C. tropicalis</i> <i>S. bouldardii</i>	<i>H. opuntiae</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. pastoris</i> <i>U. hordei</i>	<i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i>		<i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>C. glabrata</i> <i>K. marxianus</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i>		<i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Saturnispora</i> <i>T. delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>U. hordei</i>
'A49'	<i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Z. lentus</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Wic. anomalus</i>	<i>Wic. anomalus</i>
'A13'	<i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>Wic. subpelliculosa</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>D. hansenii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. subpelliculosa</i>	<i>Wic. subpelliculosa</i>

'M46'	<i>Yamadazyma spp.</i>		<i>Sch. pombe</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Wic. subpelliculosa</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. tropicalis</i> <i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>Met. sp.</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>A. pullulans</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>St. bacillaris</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. membranifaciens</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>C. diversa</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Yamadazyma spp.</i>
'K43'	<i>Y. lipolytica</i>	<i>A. pullulans</i> <i>Dek. anomala</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. pastoris</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>S'copsis schoenii</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>C. glabrata</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Wic. subpelliculosa</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>H. guilliermondii</i> <i>H. opuntiae</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. exigua</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Y. lipolytica</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>Y.lipolytica</i>
'G16'	<i>Dek. anomala</i> <i>Z. bailii</i>	<i>C. intermedia</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Z. bailii</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Z. bailii</i>	<i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i> <i>Z. bailii</i>	<i>S. boulardii</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Z. bailii</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>Cl.lusitaniae</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Z. bailii</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>H. uvarum</i> <i>Kaz. naganishii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>K. lactis</i> <i>K. marxianus</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>P. membranifaciens</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Saturnispora</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i>	<i>Z.bailii</i>

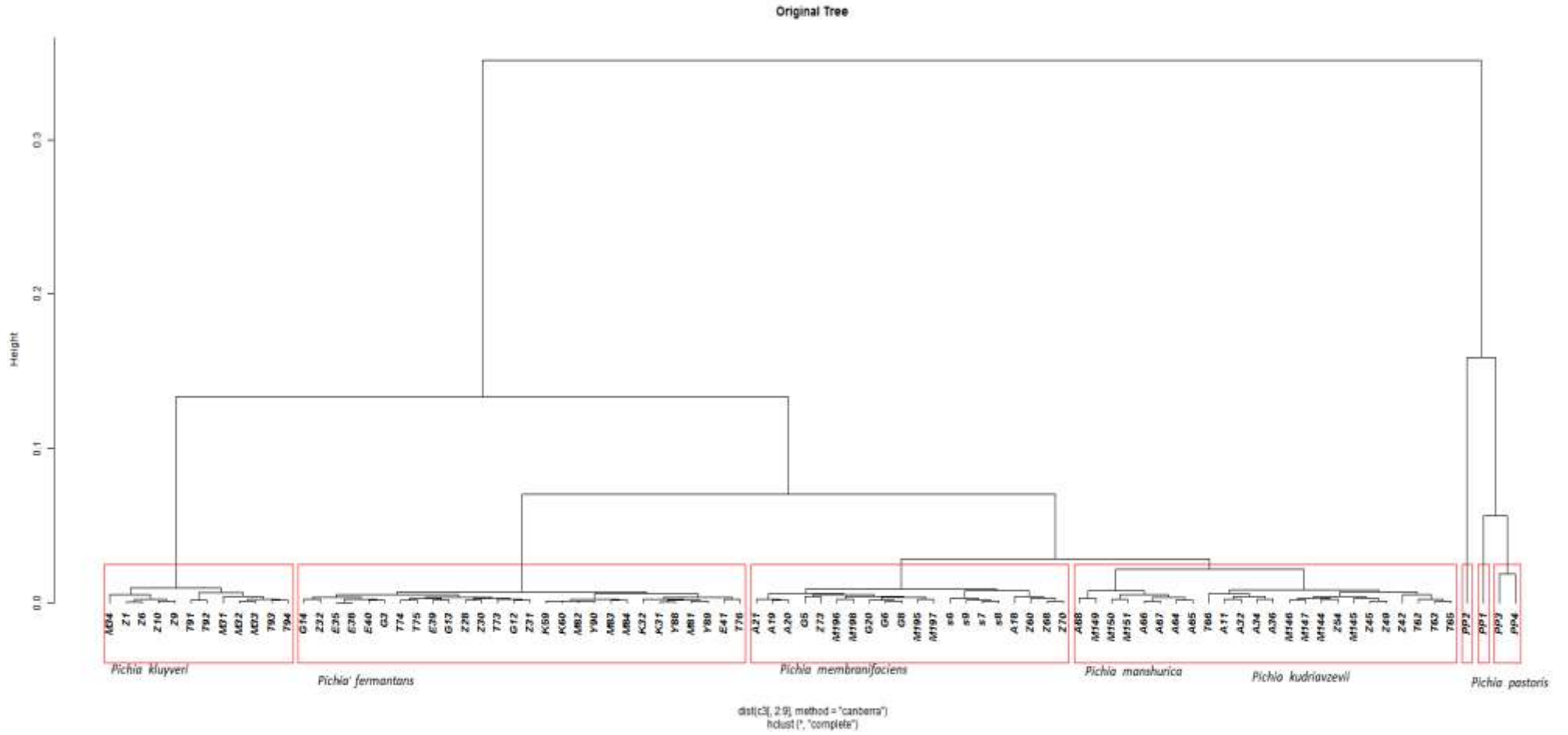
								<i>Z. bailii</i>	
'Y-7558'	<i>C. intermedia</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>S. boulardii</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>Z. bisporus</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. guilliermondii</i> <i>S'copsis vini</i> <i>Sch. pseudopoly.</i> <i>Wic. subpelliculosa</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>S. boulardii</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. bisporus</i> <i>C. ethanolica</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>H. valbyensis</i> <i>Z. bisporus</i> <i>D. hansenii</i> <i>H. uvarum</i> <i>K. marxianus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>T.delbrueckii</i> <i>U. hordei</i>	<i>Z. bisporus</i>
	<i>Z. bisporus</i>								
'Y-27275'	<i>Saturnispora spp.</i>	<i>R. mucilaginosa</i> <i>Z. lentus</i>	<i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i>	<i>C. diversa</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>St. bacillaris</i>	<i>Z. lentus</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. caribbica</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>U. hordei</i> <i>Wic. anomalus</i>	<i>Z. bisporus</i> <i>Z. lentus</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Kr. fluxuum</i> <i>Met. pulcherrima</i> <i>U. hordei</i> <i>Z. bailii</i>	<i>Z. lentus</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. kudriavzevii</i> <i>P. manshurica</i> <i>P. membranifaciens</i>	<i>C. diversa</i> <i>Z. lentus</i> <i>C. membranifaciens</i> <i>D. hansenii</i> <i>Mey. guilliermondii</i> <i>St. bacillaris</i> <i>Yamadazyma sp</i>	<i>Z. lentus</i>
	<i>R. mucilaginosa</i>								
'Y-229'	<i>Z. lentus</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>T.delbrueckii</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>Sch. pombe</i> <i>Z. rouxii</i> <i>Kaz. servazzii</i> <i>Met. fructicola</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Met. fructicola</i> <i>P. pastoris</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Z. rouxii</i> <i>Met. sp.</i>	<i>Dek. bruxellensis</i> <i>H. valbyensis</i> <i>Sch. pombe</i> <i>Z. rouxii</i> <i>A. pullulans</i> <i>C. glabrata</i> <i>P. kluyveri</i>	<i>Z. rouxii</i>
	<i>Z. rouxii</i>								



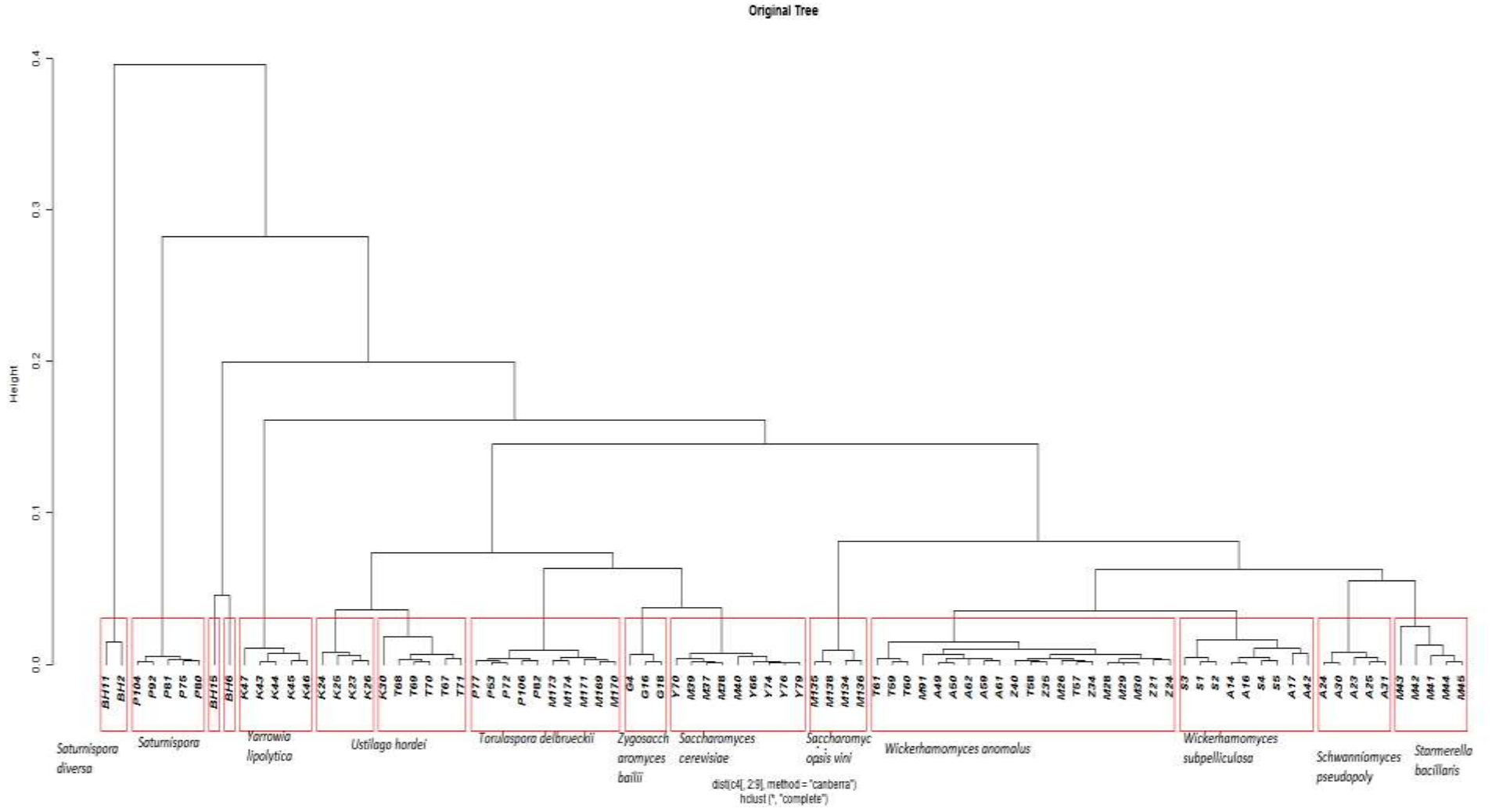
Şekil 4.6. Veritabanına kayıtlı tüm izolatların 8 farklı DNA bölgesine ait Tm değerlerinin birlikte analizi ile elde edilen dendrogram



Şekil 4.6.'nın devamı



Şekil 4.6.'nın devamı



Şekil 4.6.'nın devamı

4.4 Sonuçların Değerlendirilmesi ve Test denemeleri

Proje kapsamında geliştirilen MFMAS sisteminin test denemeleristandart maya suşları ve proje kapsamında tanımlanan bazı maya suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla maya türlerinin identifikasyonunda yaygın olarak kullanılan API ID 32 C (bioMerieux, Fransa) ticari test kitleri MFMAS yöntemi eş zamanlı uygulanarak her iki sistem birbiri ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.11).

MFMAS sistemi analiz edilen tüm örnekler için %100 eşleşme ile tanımlama gerçekleştirmiştir. API ID 32 sistemi ise 4 türün tanımlanmasında hatalı sonuç vermiştir. Buna göre Diğer türlerin tanımlanması ise %99 ve üzerindeki bir doğrulukla gerçekleştirilmiştir(Tablo 4.12).

Ayrıca 3 farklı türe ait 3 standart suş *C. sake*(NRRL Y-17808), *P. fermentans* (NRRL Y-11506), *P. kluyveri* (NRRL Y-17724) kullanılarak sistemin validasyon testleri gerçekleştirilmiştir. 3 tekkerrürlü olarak yapılan bu analizde elde edilen HRM profilleri veri tabanında her seferinde aynı verileri analiz etmiş ve analiz edilen türün tanımlanması %100 doğrulukla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Tm değerlerinin analizinde de tekrarlanabilirliği yüksek doğru sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4.11 API ID 32 C kitleri ile MFMAS sisteminin karşılaştırma testi sonuçları

Analiz Edilen Tür	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Met. fructicola</i>	<i>Y. lipolytica</i> (<i>C. lipolytica</i>)	<i>C. tropicalis</i>	<i>Cl. lusitaniae</i>	<i>Kaz. exigua</i> (<i>C. holmii</i>)
	Y-2510	Y-48589	Y-1094	Y-12968	K93	E85
GAL	+	++	±	++	++	+
ACT	+	-	++	++	-	-
SAC	++	++	±	++	+	++
NAG	-	++	++	++	++	-
LAT	-	-	++	+	±	-
ARA	+	-	-	+	±	-
CEL	+	++	-	++	+	-
RAF	++	-	-	+	-	+
MAL	++	++	-	++	+	-
TRE	++	++	-	++	++	++
2KG	-	++	-	++	++	-
MDG	-	++	-	++	++	-
SOR	+	+	-	++	++	-
XYL	+	+	-	++	+	-
RIB	+	±	++	+	-	-
GLY	±	++	++	++	+	-
RHA	-	-	-	-	-	-
PLE	++	++	-	++	+	-
ERY	-	-	++	-	-	-
MEL	-	-	-	+	-	-
GRT	-	-	-	-	-	-
MLZ	++	++	-	++	++	-
GNT	±	++	++	+	+	-
LVT	-	-	-	±	-	-
MAN	++	++	++	++	++	-
LAC	-	-	-	±	-	-
INO	-	-	-	-	-	-
GLU	++	++	++	++	+	+
SBE	-	++	±	++	++	-
GLN	-	++	-	++	+	-

Tablo 4.11'in devamı

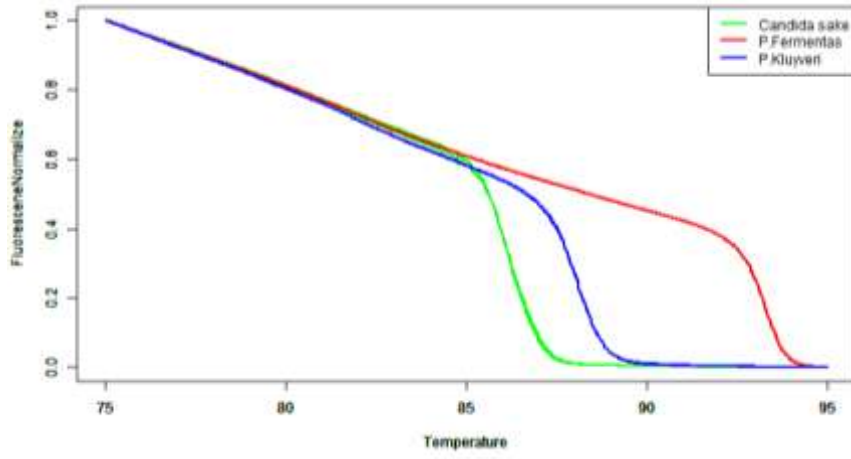
Analiz Edilen Tür	<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefir</i>)	<i>C. membranifaciens</i>	<i>C. intermedia</i>	<i>H.uvarum</i> (<i>Kl. apiculata</i>)	<i>K. lactis</i> (<i>C. sphaerica</i>)	<i>H.guillermonti</i> (<i>Kl. apis</i>)
	K64	Y-2089	E4	Y-1380	'Y-8279	Y-17528
GAL	++	++	++	-	++	-
ACT	++	-	-	±	++	+
SAC	++	++	++	-	++	-
NAG	-	++	++	-	±	-
LAT	++	±	±	-	+	-
ARA	+	++	±	-	-	-
CEL	-	++	++	±	±	+
RAF	++	++	++	-	++	-
MAL	-	++	++	-	++	-
TRE	-	++	++	-	++	-
2KG	-	++	++	±	-	±
MDG	-	++	++	-	++	-
SOR	++	++	++	-	++	-
XYL	++	++	++	-	+	-
RIB	±	++	-	-	-	-
GLY	+	++	-	-	+	-
RHA	-	-	-	-	-	-
PLE	-	++	+	-	++	-
ERY	-	++	±	-	-	-
MEL	-	++	-	-	-	-
GRT	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	++	++	-	++	-
GNT	-	++	++	±	-	+
LVT	-	-	±	-	-	-
MAN	++	++	++	-	++	-
LAC	++	-	++	-	++	-
INO	-	-	-	-	-	-
GLU	++	++	++	±	++	+
SBE	-	++	++	-	-	-
GLN	-	+	++	-	-	-

Tablo 4.11'in devamı

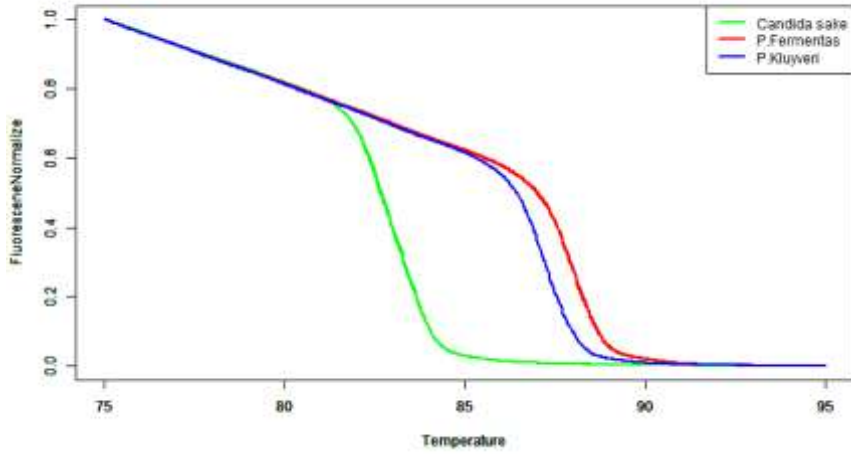
Analiz Edilen Tür	<i>Z. rouxii</i>	<i>K.marxianus</i> (<i>C. kefir</i>)	<i>P. fermentans</i> (<i>C.lambica</i>)	<i>P. membranifaciens</i> (<i>C. valida</i>)	<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	<i>C. zeylanoides</i>
	Y-229	Y-2415	Y-11506	Y-6776	Y-7551	Y-17086
GAL	±	++	-	-	-	-
ACT	+	++	-	-	-	+
SAC	+	++	-	-	-	-
NAG	++	-	++	-	++	++
LAT	++	++	+	-	+	-
ARA	++	+	-	-	-	-
CEL	++	+	-	-	-	-
RAF	+	++	-	-	-	-
MAL	+	-	-	-	-	-
TRE	++	-	-	-	-	-
2KG	-	-	-	-	-	++
MDG	+	-	-	-	-	-
SOR	+	++	-	-	-	+
XYL	±	++	++	-	-	-
RIB	+	-	-	-	-	-
GLY	++	++	±	-	+	++
RHA	-	-	-	-	-	-
PLE	++	-	-	-	-	-
ERY	-	-	-	-	-	-
MEL	++	-	-	-	-	-
GRT	±	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-	-
GNT	±	-	-	-	-	-
LVT	-	-	±	-	-	-
MAN	++	+	-	-	-	++
LAC	+	++	-	-	-	-
INO	++	-	-	-	-	-
GLU	++	++	++	++	++	++
SBE	-	-	-	-	-	-
GLN	-	-	++	++	++	+

Tablo 4.12. API ve MFMS sonuçlarının karşılaştırılması

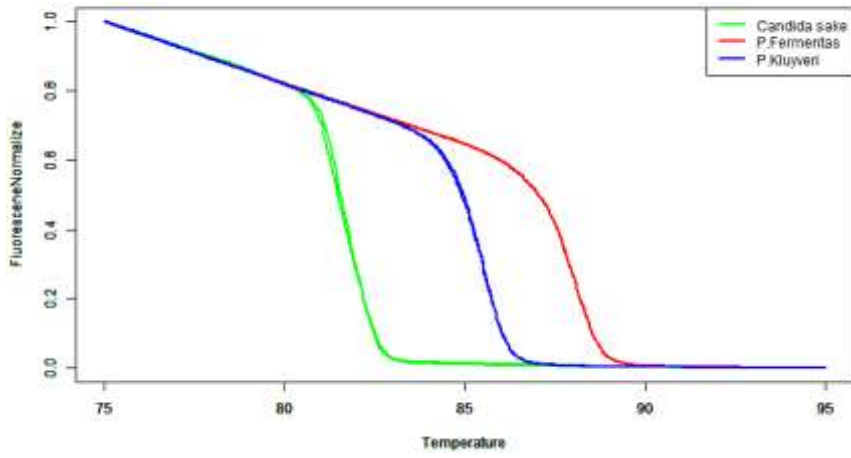
Analiz Edilen Maya Türü ve Kodu		API		MFMS	
		Tanımlanan Tür		Tanımlanan Tür	
Tür	Örnek Kod	Tür	%		%
<i>R.mucilaginosa</i>	NRRL 'Y-2510	<i>R.mucilaginosa</i>	%99.5	<i>R.mucilaginosa</i>	100
<i>Met. fructicola</i>	NRRL 'Y-48589	<i>C. pulcherrima</i>	%99.7	<i>Met. fructicola</i>	100
<i>Y. lipolytica (C. lipolytica)</i>	NRRL "Y-1094	<i>C. lipolytica</i>	%99.9	<i>Y. lipolytica</i>	100
<i>C. tropicalis</i>	NRRL "Y-12968	<i>C. guilliermondii</i>	%99.8	<i>C. tropicalis</i>	100
<i>C. membranifaciens</i>	NRRL 'Y-2089	<i>C. membranifaciens</i>	%99.9	<i>C. membranifaciens</i>	100
<i>H.uvarum (Kl. apiculata)</i>	NRRL 'Y-1380	<i>Kl. apiculata</i>	%99.9	<i>H.uvarum</i>	100
<i>K. lactis (C. sphaerica)</i>	NRRL 'Y-8279	<i>C. sphaerica</i>	%99.9	<i>K. lactis</i>	100
<i>H.guilliermondii (Kl. apis)</i>	NRRL 'Y-17528	<i>Kl. apiculata/Kl.apis</i>	%99.9	<i>H.guilliermondii</i>	100
<i>Z. rouxii</i>	NRRL 'Y-229	<i>Cr. humicola</i>	97%	<i>Z. rouxii</i>	100
<i>K.marxianus (C. kefir)</i>	NRRL 'Y-2415	<i>C. kefir</i>	%99.9	<i>K.marxianus</i>	100
<i>P. fermentans (C.lambica)</i>	NRRL 'Y-11506	<i>C.lambica</i>	%99.3	<i>P. fermentans</i>	100
<i>P. membranifaciens (C. valida)</i>	NRRL "Y-6776	<i>C. valida</i>	90%	<i>P. membranifaciens (C. valida)</i>	100
<i>P. Kudriavzevii (C. krusei)</i>	NRRL 'Y-7551	<i>C. krusei</i>	%94.8	<i>P. kudriavzevii</i>	100
<i>C. zeylanoides</i>	NRRL 'Y-17086	<i>C. zeylanoides</i>	%99.9	<i>C. zeylanoides</i>	100
<i>D. hansenii</i>	P17	<i>C. famata</i>	%99.5	<i>D. hansenii</i>	100
<i>Cl.lusitaniae</i>	K93	<i>C. pulcherrima</i>	%94.4	<i>Cl.lusitaniae</i>	100
<i>Kaz. exigua (C. holmii)</i>	E85	<i>C. holmii</i>	%99.2	<i>Kaz. exigua</i>	100
<i>K.marxianus (C. kefir)</i>	K64	<i>C. kefir</i>	%99.9	<i>K.marxianus</i>	100
<i>C. intermedia</i>	E4	<i>C. intermedia</i>	%97.4	<i>C. intermedia</i>	100



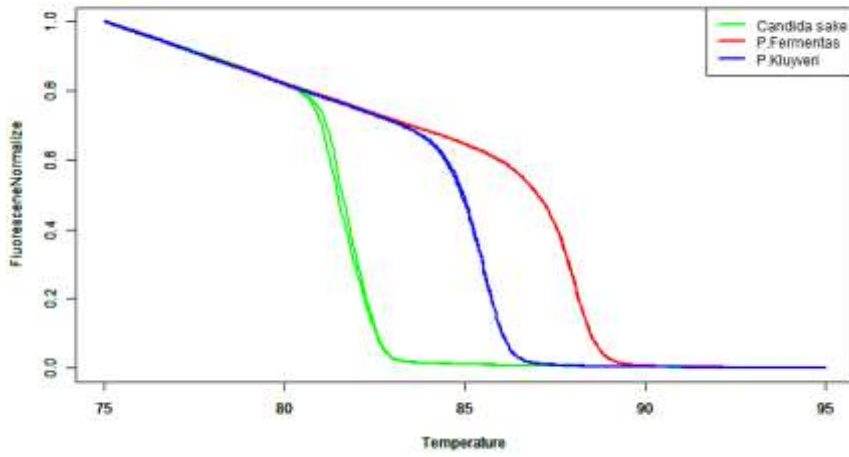
a. Esr1-ESr2 primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları



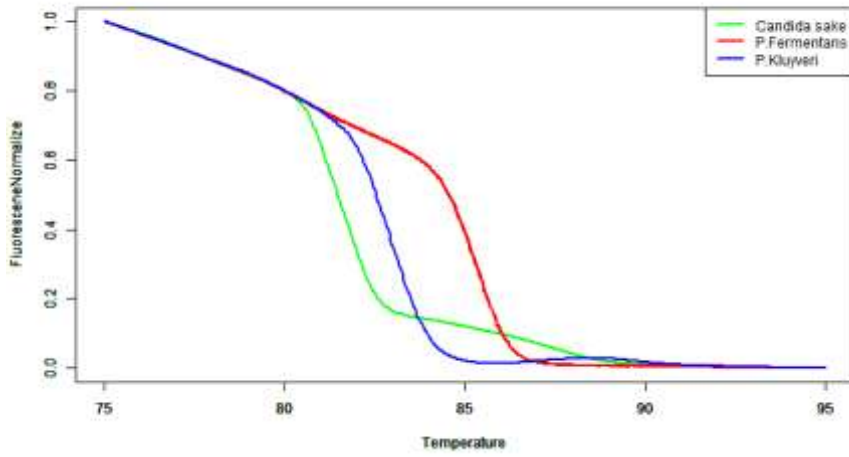
b. Fzg1-Fzg2 primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları



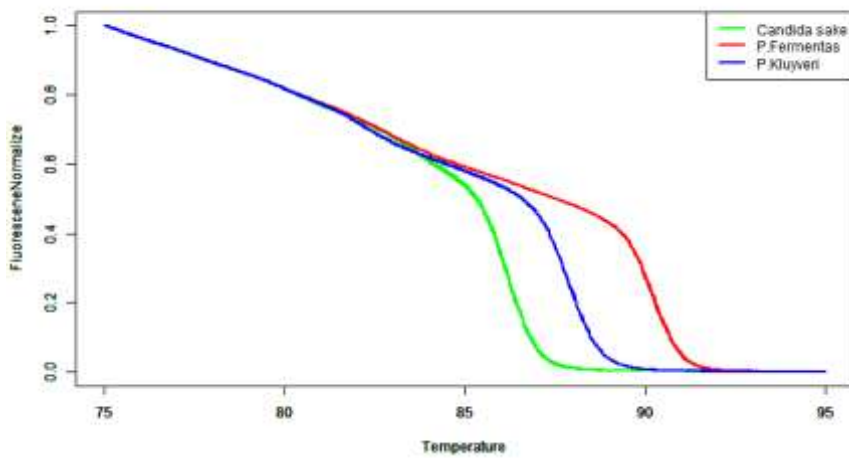
c. NL1-LS2 primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları



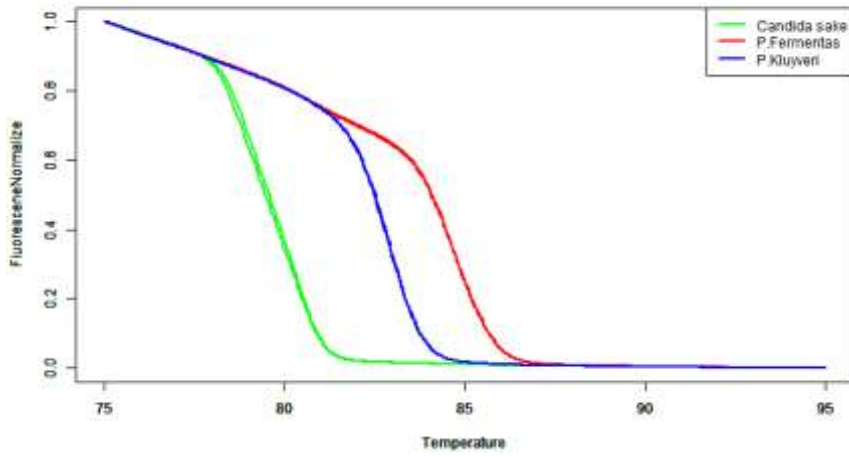
U1-U2 primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları



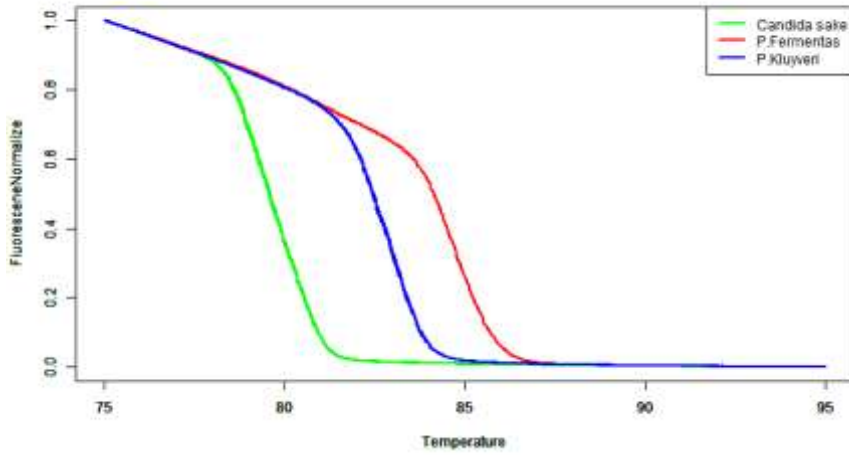
d. SS1f-SS1r primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları



e. CH12f-CH12r primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları



f. MnF-MnR primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları



g. My3f-My3r primerleri ile elde edilen HRM analizine ait validasyon sonuçları

Şekil 4.7. MFMAS sisteminin HRM analizine ait validasyon testi görüntüleri

Tablo 4.13. Tm Değerlerine Ait Validasyon Testi Sonuçları

Maya Türleri	Esr1-Esr2	S.S.	Fzg1-Fzg2	S.S.	MnF-MnR	S.S.	My3f-My3r	S.S.	SS1f-SS1r	S.S.	NL1_LS2	S.S.	U1-U2	S.S.	CH12f-CH12r	S.S.
<i>C. sake</i> (NRRL Y-17808)	86,35	0,07	83,18	0,03	81,50	0,06	79,87	0,06	81,69	0,00	81,77	0,04	83,89	0,04	81,19	0,01
	86,28	0,02	83,07	0,05	81,46	0,05	79,57	0,22	81,51	0,00	81,71	0,02	83,75	0,04	81,15	0,05
	86,28	0,04	83,07	0,02	81,41	0,06	79,73	0,06	81,49	0,02	81,69	0,00	83,76	0,02	81,15	0,01
Ortalama	86,30	0,05	83,10	0,03	81,46	0,06	79,72	0,11	81,56	0,01	81,72	0,02	83,80	0,03	81,16	0,02
<i>P. fermentans</i> (NRRL Y-11506)	93,20	0,05	87,99	0,02	85,35	0,08	84,68	0,01	85,30	0,02	87,94	0,01	91,05	0,01	90,23	0,02
	93,21	0,05	87,96	0,00	85,29	0,05	84,72	0,01	85,33	0,02	87,97	0,02	91,06	0,02	90,26	0,02
	93,19	0,06	87,98	0,02	85,29	0,08	84,70	0,01	85,19	0,02	87,99	0,01	91,08	0,03	90,22	0,03
Ortalama	93,20	0,06	87,98	0,01	85,31	0,07	84,70	0,01	85,27	0,02	87,97	0,01	91,06	0,02	90,24	0,03
<i>P. kluyveri</i> (NRRL Y-17724)	88,05	0,06	87,20	0,04	83,40	0,05	82,76	0,01	82,88	0,02	85,45	0,04	86,01	0,02	87,74	0,05
	88,10	0,03	87,22	0,04	83,46	0,05	82,80	0,01	82,90	0,02	85,47	0,01	86,07	0,06	87,77	0,04
	88,08	0,03	87,19	0,06	83,45	0,01	82,79	0,01	82,89	0,02	85,52	0,02	86,08	0,03	87,82	0,06
Ortalama	88,07	0,04	87,20	0,05	83,43	0,04	82,78	0,01	82,89	0,02	85,48	0,02	86,05	0,04	87,77	0,05

5 SONUÇ VE TARTIŞMA

Gıdaların bozulması, duysal ve yapısal özelliklerinde oluşan arzu edilmeyen değişiklikler sonucunda tüketilebilme özelliğini kaybetmesidir. Bozulan bir gıdanın yapı, görünüş, renk, tat ve kokusunda çeşitli fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelir. Bu değişimler bir taraftan gıdayı yenilemez hale getirerek ekonomik yönden kayıplara neden olurken diğer yandan da gıdayı sağlık açısından zararlı ve riskli hale getirebilirler. Bir gıdanın bozulması demek, sadece ürünün değil, o ürünün tarladan sofraya kadar olan her bir aşamasında kullanılan tüm kaynakların, sarf edilen enerjinin, iş gücünün ve zamanın da kaybolması demektir (Evren vd. 2009).

Gıda bozulmasında en önemli etken mikroorganizmalardır. Gıdalara çeşitli şekillerde bulaşan mikroorganizmalar onları kendi gelişmeleri için besin kaynağı olarak kullanırlar. Mikroorganizmalar gıdalara bulaştıktan sonra hızla çoğalır, besin öğelerini tüketir, enzimatik değişimlere yol açar ve yeni bileşikler sentezleyerek ya da mevcut bileşikleri parçalayarak hoşla gitmeyen tat ve aroma oluştururlar veya gıdanın tekstüründe değişikliklere neden olurlar.

Günümüzde ise; çeşitli enzimlerin, pigmentlerin ve probiotiklerin üretiminde kullanılmakta, gıda ve yemler için spesifik bileşenlerin, ilaç endüstrisi için birçok biyokimyasal maddenin elde edilmesinde büyük önem taşımaktadırlar (Gürsoy ve Kınık, 2002). Bununla birlikte birçok maya türü bozulma yapan bakterilerin gelişemedikleri ortamlarda (düşük su aktivitesi, yüksek tuz/şeker konsantrasyonu, düşük pH) hızla gelişerek arzu edilmeyen değişikliklere neden olmakta ve sonuçta bu ürünlerin değişik şekillerde bozulmalarına yol açmaktadır. Gıdalara çeşitli şekillerde bulaşarak gelişen mayaların lipolitik, proteolitik ve pektolitik aktiviteleri ve fermentasyon sonucu oluşan ürünlerinin gıdanın tat, koku ve tekstürünü olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Diğer taraftan gıdalarla birlikte yüksek sayılarda oportunistik maya hücrelerinin canlı olarak vücuda alınması, bir takım sağlık sorunlarını da ortaya çıkabilmektedir (Hazen,1995; Krcmery ve Barnes, 2002; Fleet ve Balia 2006).

Mayalar, ekmek, bira, şarap ve diğer alkollü içeceklerin birincil fermentasyonunda, peynir, kefir, yoğurt gibi süt ürünlerinin, sucuk, sosis gibi et ürünlerinin, turşu ve zeytinin ise sekonder fermentasyonunda rol almalarının yanı sıra B12, β -karoten gibi vitaminlerin, çeşitli

enzimlerin, pigmentlerin, prebiyotiklerin, polisakkaritlerin ve lipidlerin, gıda ve yemler için bazı spesifik bileşenlerin, gliserol gibi alkollerin ve tek hücre proteinin endüstriyel olarak üretiminde kullanılmaktadır (Jakobsen ve Norvhus, 1996). Diğer taraftan maya kaynaklı mikrobiyal bozulmalar, ürünün duyu özelliklerini değiştirip onları tüketilmeyecek bir hale getirerek önemli ekonomik zararlara yol açmaktadır. Diğer taraftan yüksek sayılarda opportunistik maya hücrelerinin canlı olarak vücuda alınması sonucunda bir takım sağlık sorunları da ortaya çıkabilmektedir (Hazen, 1995; Krcmery and Barnes, 2002).

Mayaların gıda bozulmalarındaki önemi giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Maya türlerinin doğru bir şekilde identifikasyonu, gıda sistemlerindeki fizyolojik ve ekolojik özelliklerine bağlı olarak bozucu potansiyellerinin belirlenmesine katkı sağladığı gibi prosesin teknolojik yönden geliştirilmesine ve ürün kalitesinin arttırılmasına da imkan sağlar (Deák 2008). Diğer bir ifade ile gıda üretim hattında proses kontrolünün rutin bir parçası olarak, üründe bozulma ya da kalite düşmesine neden olan mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tespiti kaliteli bir üretim için zorunlu görülmektedir.

Mayaların geleneksel tanımlama yöntemleri büyük ölçüde biyokimyasal yöntemlere dayanmakta, düşük su aktivitesi ve yüksek sıcaklıkta gelişme gibi bazı fizyolojik testlerle desteklenmektedir. Bununla birlikte, bakterilere kıyasla mayaların sınırlı morfolojik heterojenite sergilediği bu nedenle geleneksel yöntemlerle yapılan tanımlamanın yetersiz olacağı bildirilmiştir (Van der Vossen vd., 2003).

Gıdalarda istenmeyen değişiklikler oluşturan mayaların tanımlanmalarında kullanılan geleneksel yöntemlerin ve ticari kitlerin, zaman alıcı olduğu ve bazen yanlış tanımlamalara yol açtığı göz önüne alındığında, maya tanımlamada daha güncel olan moleküler yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Moleküler metotların kullanılması identifikasyon metotlarını radikal bir şekilde değiştirmiş ve türlerin tanımlanmasında yeni bir bakış açısı sağlamıştır. Mayaların tanımlanmaları amacıyla kullanılan moleküler yöntemler arasında özellikle PCR'a dayalı yöntemlerin, daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmesine olanak sağladığı için daha çok tercih edildiği görülmektedir (Deák 2008).

Son yıllarda, PCR tekniğinde amplifiye edilen çift zincirli DNA fragmentlerinin floresans boyalarla verdiği sinyallerin ölçümüne dayalı erime eğrisi analizi, başta mutasyon taramaları olmak üzere tanı ve teşhis amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çift zincirli

DNA fragmentlerinin %50'sinin tek zincirli duruma geldiği sıcaklığa “erime sıcaklığı (T_m derecesi)” adı verilmektedir. T_m derecesi DNA parçasının uzunluğuna ve içerdiği %Guanin+Sitozin (%G+C) miktarına bağlı olarak değişiklik gösterir. T_m analizi farklı türlere ait PCR ürünlerinin erime derecelerinin birbiri ile karşılaştırılarak analiz edilmesine dayanmaktadır.

Yüksek çözünürlüklü erime (High Resolution Melting, HRM) analizi, çift zincirli DNA fragmentlerinin, son PCR döngüsünden sonra sıcaklığın 60°C'den 95 °C'ye 1-2°C/saniye hızla çıkarken tek zincirli DNA'ya ayrılması ve bu sırada floresans ışımada oluşan karakteristik değişimin analiz edilmesine dayanır. Çift zincirli DNA'nın sıcaklık artışı ile birlikte zincirlerinin ayrılmasına denatürasyon denir. DNA'nın denatürasyonu süresince floresan boyaların yaptığı ışımanın şiddetinde meydana gelen değişimler, real-time PCR cihazının florometrik detektörü yardımıyla ölçülerek analiz edilmektedir. HRM analizinde kullanılacak DNA fragmentleri genom üzerindeki hedef DNA bölgelerinin PCR tekniği kullanılarak amplifiye edilmesiyle elde edilir.

HRM analizinin etkinliği, ampikonun saflığına kullanılan floresan boyaya ve analizin gerçekleştiği cihazın kapasitesine bağlıdır. HRM uygulamaları için ısıl stabilitesi ve hassasiyeti yüksek real-time PCR deteksiyon sistemine ve HRM ile uyumlu bir yazılıma ihtiyaç vardır. Real-time PCR ekipmanları ile erime davranışının ayrıntılı bir şekilde analizinin yapılması için, çok küçük sıcaklık artışlarını (0.01–0.2 °C) uygulayabilen hassas bir sıcaklık kontrolü ve ileri bir florometrik optik sistem ve gelişmiş veri toplama ünitesi ile donatılmış olması gerekir (Druml ve Cichna-Markl, 2014). Gelişmiş real-time PCR cihazlarının yeni nesil floresan boyalar ile kombinasyonu nükleik asit dizilerindeki küçük varyasyonların bile tanımlanmasına imkan vermektedir (Garritano vd., 2009).

HRM teknolojisine dayalı genetik mutasyon kitleri tıpta yoğun olarak kullanılmasına rağmen bir mikroorganizma tanımlama yöntemi olarak potansiyeli henüz yeni yeni anlaşılmakta bu nedenle konuyla ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, sığır mastitis patojenlerinin tanımlanmasına yönelik olarak mastitise sebep olan 12 patojen bakteri türü ve 14 koagülaz-negatif stafilokok türü HRM analizine tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda türlerin ayrımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve HRM analizinin mastitisli patojenlerin belirlenmesinde hızlı, ucuz, yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip başarılı bir araç olduğu vurgulanmıştır (Ajitkumar vd., 2012). Diğer taraftan Kesmen ve ark. (2014)

tarafından yapılan bir çalışmada sucuktan izole edilen katalaz pozitif kokların gruplandırılması ve identifikasyonu amacıyla HRM ve Tm analizi kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Yine HRM analizinin sirke ve sirke anası örneklerinden izole edilen asetik asit bakterilerinin gruplandırılmasında da başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. (Yetiman ve Kesmen 2015). Kao vd., (2007)ise, laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında HRM kullanmışlardır. Ancak bugüne kadar maya türlerinin tanımlanmasına yönelik HRM ve Tm analizine dayalı olarak geliştirilmiş herhangi bir yöntem veya sisteme rastlanmamıştır.

Proje kapsamında geliştirilen maya türlerini tanımlamaya yönelik sistemin (MFMAS) esası, maya türleri arasında değişkenliği yüksek DNA fragmentlerinin HRM eğrileri ve Tm değerlerinin analiz edilmesine dayanmaktadır. Sistem aynı türe ait çok sayıda DNA fargmentini eş zamanlı olarak analiz edebilmekte ve diğer türlerle karşılaştırabilmektedir. Mikroorganizma tanımlama sisteminin içerdiği yazılım sayesinde, HRM eğrileri ve Tm değerlerinin görselleştirilmesi, analiz edilmesi, karşılaştırılması ve depolanması gerçekleştirilmektedir. Analiz koşullarından ileri gelen hataları minumuma indirmek ve tekrarlanabilirliği maksimum düzeye çıkarabilmek için sistem, her bir mikroorganizma türünün erime eğrilerini, referans suşun eğrileri ile karşılaştırmakta ve sapma miktarını dikkate alarak sistemi standardize etmektedir. Sistem son derece özgün olup, şimdiye kadar bu prensiple tanımlama yapan başka bir analiz sistemine rastlanmamıştır.

MFMAS sistemine ait yazılım, tanımlanacak maya türlerinin her bir DNA bölgesi için elde edilen verileri veri tabanında kayıtlı türlerin verileri ile karşılaştırıp benzerlik oranına göre tanımlama yapmaktadır. Veri tabanı her bir türe ait en az 4 suş (strain) kullanılarak oluşturulmuş her bir suşun 8 farklı DNA bölgesine ait HRM eğrilerini ve Tm değerlerinin depolandığı bir veri bankasıdır.

Tanımlamada kullanılacak plate, üzerinde bulunan kuyucuklar içerisinde PCR reaksiyonu ve sonrasında HRM ve Tm analizi gerçekleştirildiği real-time PCR cihazları ile uyumlu malzemedir. Plate'in konfügrasyonu, 8 farklı DNA bölgesinin eş zamanlı olarak analizinin yapılmasına imkan tanımaktadır. Plate'in ilk sütunu (1. sütun) DNA içermeyen negatif kontrol sütunu, plate'in 2. sütunu ise yalnızca referans suşun DNA'sının reaksiyona girdiği pozitif kontrol sütunudur. Geriye kalan diğer sütunlarda ise 3-12. sütunları, tanımlanacak izolatlara ait kalıp DNA'ların PCR reaksiyonu ve sonrasında HRM ve Tm analizinin

gerçekleştigi sütunlardır. Bu sütunlarda 10 adet mikrobiyal izolatın eş zamanlı analizi yapılabilmektedir.

Maya tanımlama sistemi, toprak, su, gıda, yem vs. gibi çeşitli çevresel ve biyolojik materyallerden izole edilerek saflaştırılan mikrobiyal izolatların tür seviyesinde tanımlanması için uygun bir sistem olup veri tabanının farklı ortamlardan izole edilecek maya türlerini içine alçak şekilde genişletilmesi veya güncellenmesi mümkündür.

Mikroorganizma tanımlama sistemi ile tür tayini, her bir mikroorganizma türü için 8 farklı DNA bölgesinin, eş zamanlı analizine dayanmaktadır. Analiz edilen hedef DNA bölgeleri, farklı mikroorganizma türleri arasında değişkenliği yüksek fakat tür içerisinde düşük değişkenlik gösteren bölgeleri kapsamaktadır.

Sistemin yazılımı, HRM ve Tm verilerinin depolanması, görselleştirilmesi ve analiz edilmesi amacıyla geliştirilmiş bir yazılımdır. Sistemin yazılımında PCR ürünlerinin artan sıcaklığa karşı floresans şiddetindeki değişime ait sayısal veriler .RDML (real time PCR markup language) uzantılı dosyalara çevrilmektedir. Elde edilen .RDML (real time PCR markup language) uzantılı dosyalar R dili ile analiz edilerek HRM ve Tm değerleri elde edilmektedir. Daha sonra 8 farklı DNA bölgesi kullanılarak elde edilen HRM ve Tm verileri ön işlemden geçirilerek kaydedilmektedir. Bilinen mikroorganizma türlerine ait her veri referans suşa ait verilerle kıyaslanarak HRM ve Tm fark verileri elde edilmektedir. Bu yöntem sayesinde çevresel etmenlerden kaynaklanan hatalar da minimuma indirilmektedir. Bu işlem tüm veriler için tekrarlanarak tür tayininde kullanılacak veri tabanı elde edilmektedir.

Analiz edilecek mikrobiyal izolatın verileri veri tabanındaki diğer türlerle karşılaştırılarak ait olduğu türün tespit edilmektedir. Karşılaştırma işlem için Öklit algoritması kullanılmaktadır. Karşılaştırma işlem 8 ayrı DNA bölgesi için tekrar edilmekte, mevcut türler ile eşleşme esasına göre tür seviyesinde tanımlama yapılmaktadır. Veri tabanında bulunmayan türler için ise cins seviyesinde tanımlama yapılabilmektedir.

Proje kapsamında geliştirilen MFMAS sisteminin maya türlerinin tanımlanmasında sağlayacağı avantajlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Maya tanımlama sistemi doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir. Çünkü;

- Genotopik bir yöntem olduğu için çevresel koşullardan etkilenmemektedir.
- Yöntem optimize ve standardize edildiği için analizci veya laboratuvar koşullarındaki değişikliklerden sonuçlar etkilenmemektedir.
- Analizin PCR'ın gerçekleştiği tüpte yapılması yani kapalı tüp sistemi olması olası kontaminasyon riskini azaltmaktadır.
- Yöntem referans suş ile her analizde standardize edildiği için kimyasal malzemeler, cihaz ve analizci değişikliğinden etkilenmemektedir.
- Kütüphaneye dahil edilen her bir mikroorganizma türü en az 4 suş (strain) ile temsil edilmektedir.
- Mikroorganizma tanımlama sistemi hem HRM eğrileri hem de Tm değerlerinin analizine dayalı olarak tanımlama yapmaktadır.

2. Mikroorganizma tanımlama sistemi tüm real-time PCR cihazlarına uyumludur. Çünkü;

- Yöntemin yazılımı HRM ve Tm analizi yapabilen tüm real-time PCR cihazlarına uyumlu hale getirilebilmektedir.
- Sistemde kullanılan plate tüm cihazlara uyumlu olarak üretilmektedir.

3. Mikroorganizma tanımlama sisteminin doğruluğu ve etkinliği yüksektir. Çünkü;

- Sekans analizi gibi pahalı bir yönteme gerek duyulmaksızın, genom üzerinde türler arasındaki heterojenliği yüksek olan ribozomal RNA genleri, ITS ve ISR bölgeler vb. hedef alınmaktadır.
- Her bir örnek için söz konusu hedef genler üzerinde yer alan değişkenliği yüksek toplam 8 farklı DNA fragmentinin HRM ve Tm analizi eş zamanlı olarak yapılabilir.
- Tanımlamanın esası, ayırım gücü oldukça yüksek olan HRM ve Tm analizine dayanmaktadır. Bu yöntem tek nükleotidlik polimorfizmleri dahi ayırt edebilmektedir.

4. Mikroorganizma tanımlama sistemi hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Çünkü;

- PCR sonrası uzun ve zahmetli işlemlere ihtiyaç duyulmamaktadır.
- Eş zamanlı olarak 8 farklı DNA fragmentinin çoklu HRM ve Tm analizi yapılabilir.
- HRM ve Tm sonuçları sistemin yazılımı içindeki veri tabanından taranarak ilave bir işleme ihtiyaç duyulmaksızın tür seviyesinde tanımlama kısa bir süre içerisinde yapılabilir.

5. Mikroorganizma tanımlama sisteminin analizci ve çevreye herhangi bir toksik etkisi bulunmamaktadır. Çünkü;

-Birçok genotipik yöntemde olduğu gibi PCR sonrasında kullanılan toksik etkili ethidium bromür gibi kimyasallara ihtiyaç duyulmamaktadır.

-Ethidium bromür ile kontamine olan atıkların neden olduğu çevresel problemler oluşmamaktadır.

6. Mikroorganizma tanımlama sisteminin tanımlama aralığı (spektrumu) oldukça geniştir. Çünkü;

- Mikroorganizma tanımlama sisteminin veritabanı Microsoft Sql Server programı sayesinde sürekli güncellenip yeni türler eklenerek genişletilme imkanına sahiptir.

7. Mikroorganizma tanımlama sisteminin kullanımı kolaydır, tecrübeye dayalı bir değerlendirme gerektirmemektedir. Çünkü;

- Yarı otomatize bir sistem olup, sonuçlar sistemin yazılımından otomatik olarak analiz edilerek değerlendirilmektedir.

-Sistem laboratuvar işlemlerini azaltılarak iş gücü kayıpları ve analizci hatalarını minimuma indirmektedir.

Sonuç olarak proje kapsamında maya tanımlanmasında karşılaşılan metot kaynaklı yetersizliklere ve güçlüklerle çözüm olabilecek çok sayıda avantaja sahip yeni bir tanı sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen sistem bir prototip olup, veri tabanında ancak 939 maya suşuna ait 51 maya türünün verileri kayıt edilmiştir. Dolayısıyla sistemin yeni tanımlanacak türlerle veritabanının genişletilmesi ve değişkenliği çok daha yüksek hedef DNA bölgelerinin araştırılarak sisteme kaydedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Addis, E., Fleet, G.H., Cox, J.M., Kolak, D., Leung, T. 2001. "The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses", *International Journal of Food Microbiology*, 69, 1–2.
- Ajitkumar, P., Barkema, H. W., De Buck, J. 2012. "Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16s rDNA sequences", *Veterinary Microbiology*, 155, 332–340.
- Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M. 2006. "Yeast autolysis in sparkling wine – a review", *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 119–217.
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A. 2000. "Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products", *Letters in Applied Microbiology*, 30, 5– 9.
- Apan, M., Tutkun, M., Evren, S. 2011."Geleneksel gıdalarda bulunan bozulma etkeni mayalar", *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, **9**, 18-21.
- Aran, N., 2010. Gıda Biyoteknolojisi. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 494 s.
- Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., Parish, M. E. 2002. "Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods", *Applied and Environmental Microbiology*, 98, 1955-1961.
- Arroyo-López, F.N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., Garrido-Fernández, A. 2012. "Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms", *International Journal of Food Microbiology*, 160, 42–49.
- Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J. 1999. "Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth", *Food Control*, 10, 27–34.
- Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., Torriani, S. 2003. "Development of reverse transcription (RT)- PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products", *Applied*

and Environmental Microbiology, 69, 4116–4122

Bonjean, B., Guillaume, L.D. 2003. Yeasts in bread and baking products, pp. 289– 307. In: Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects, Eds T. Boekhout and V. Robert, B. Behr's Verlag, Hamburg.

Breuer, U., Harms, H. 2006. "*Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential", Yeast, 23, 415–437.

Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2005. "Yeast diversity in hypersaline habitats", FEMS Microbiology Letters, 244, 229–234.

Buzzini, P., Martini, A. 2002. "Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments", Journal of Applied Microbiology, 93, 1020-1025.

Buzzini, P., Romano, S., Turchetti, B., Vaughan, A., Pagnoni, U.M., Davoli, P. 2005. "Production of volatile organic sulfur compounds (VOSCs) by basidiomycetous yeasts", FEMS Yeast Research, 5, 379–385.

Cadez N., Raspor P., de Cock A.W., Boekhout T., Smith M.T. 2002. "Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*", FEMS Yeast Research, 1, 279–280

Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A., Giudici, P. 2001. "Identification of *Pichia anomala* isolated from yogurt by RFLP of the ITS region", International Journal of Food Microbiology, 71, 71–73.

Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D. 1996. "Phylogenetic relationship among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences", International Journal of Systematic Bacteriology, 4, 542– 549.

Carreira, A.L., Paloma, V. Louriero. 1998. "Pigment producing yeasts involved in the brown, surface discoloration of ewe's cheese", International Journal of Food Microbiology, 41, 223–230.

Casey, G.D., Dobson, A.D. 2004. "Potential of using real-time PCR-based detection of

spoilage yeast in fruit juice – a preliminary study", *International Journal of Food Microbiology*, 91, 327–335.

Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., Todd, B.E.N. 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 2–8.

Cheng, J.-C., C.-L. Huang, C.-C. Lin et al. 2006. "Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR", *Clinical Chemistry*, 52, 1997–2004.

Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. 2000. "Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations", *FEMS microbiology letters*, 189(1), 81-87.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., Comi, G., 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1347–1355.

Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C., Cocolin, L. 2000. "Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy)", *International Journal of Food Microbiology*, 58, 117–121.

Cosa, G., Focsaneanu, K.-S., McLean, J. R. N., McNamee, J. P., Scaiano, J. C. 2001. "Photophysical properties of fluorescent DNAdyes bound to Single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution", *Photochemistry and Photobiology*, **73**, 585–599.

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D. 2006. "Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations", *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130–135.

Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W., de Baros-Lopes, M.A. 2007. "Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries", *FEMS Yeast Research*, 7, 471–481.

Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G., Çakır, İ. 2008. Mikrobiyoloji. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:36, Bizim Büro Basımevi, Ankara.

Davenport, R.R. 1980. Cold-tolerant yeasts and yeast-like organisms, pp. 215–230. *In: Biology and Activities of Yeasts*, Eds: F.A. Skinner, S.M. Passmore and R.R. Davenport, Academic Press, London.

Deák, T. 2006. Environmental factors influencing yeasts. pp. 155–174. *In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Eds: C. A. Rosa and G. Peter). Springer-Verlag, Berlin.

Deák, D. 2008. *Handbook Of Food Spoilage Yeasts*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton - New York, pp:221-245.

Deak, T. 1991. "Foodborne yeasts". *Advances in Applied Microbiology*, 36, 179– 278.

Deak, T. 1995. "Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods", *Trends in Food Science & Technology*, 6, 287-292.

Deák, T., Beuchat, L.R. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Raton, pp. 210.

Deák, T., Chen, J., Beuchat, L. R. 2000. "Molecular characterization of *Yarrowialipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry", *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4340–4344.

Dennis, C., Buhagiar, R.W.M. 1980. Yeast Spoilage of. Fresh and Processed Fruits and Vegetables, (Ed: Skinner, F.A.), *Biology and Activities of Yeasts*, Academic Press, London, 123-133.

Dillon, V. M. 1998. Yeasts and moulds associated with meat and meat products. pp. 85–117. *In: The Microbiology of Meat and Poultry*, Eds: Davies, A. and Board, R., Blackie Acad. Profess., London.

Dillon, V. M., Board, R. G. 1991. "Yeasts associated with red meats", *Journal of Applied Bacteriology*, **71**, 93–108.

Dorak, M.T. 2006. Real-time PCR, School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne, pp: 39 – 62.

Druml, B., Cichna-Markl, M. 2014. "High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its

role and potential in food analysis", *Food Chemistry*, 158, 245–254.

Dufour, J.P., Verstrepen, K., Derdelinckx, G. 2003. Brewing yeasts, pp. 347–388. *In: Yeasts in Food*, (Eds: T. Boekhout and V. Robert). Beneficial and Detrimental Aspects. Behr's Verlag, Hamburg.

Erkmen, O., Bozoğlu, F. 2008. *Food Mikrobiyoloji I*. İlke yayınevi, Ankara.

Fleet, G. H. 1992. Yeast Spoilage of Foods and Beverages, pp. 53-64. *In: The Yeasts: A Taxonomic Study* Eds: Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T. Elsevier, London.

Fleet, G. H. 2011. "Yeast spoilage of foods and beverages." *The yeasts, a taxonomic study*. 53-63

Fleet, G. H., Mian M. A. 1987. "The occurrence and growth of yeasts in dairy products", *International Journal of Food Microbiology*, 4: 145-155.

Fleet, G.H. 1990. "Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*", 68, 199–211.

Fleet, G.H. 1992. "Spoilage yeasts", *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 1–44.

Fleet, G.H. 2006. *Saccharomyces* and related genera. pp. 306–335. *In: Food Spoilage Microorganisms*, Eds: C. de W. Blackburn, Woodhead Publishing, Cambridge.

Fleet, G.H., 1998. The microbiology of alcoholic beverages, pp. 217–262. *In: The Microbiology of Fermented Foods*, (Eds: B.J. Wood). 2nd edn. Vol. 1. Blackie Academic and Professional, London.

Forsythe, S. J. 2004 *Microbiologia da segurança alimentar*, Porto Alegre, Artmed,

Garritano, S., Gemignani, F., Voegelé, C., Nguyen-Dumont, T., Le Calvez-Kelm, F., De Silva, D., ... & Tavtigian, S. V. 2009. Determining the effectiveness of high resolution melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genetics*, 10, 5.

Guerzoni, M.E., Lancotti, R., Marchetti, R. 1993. "Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods", *International Journal of Food Microbiology*, 17, 329–341.

Gullo, M., Romano, A. D., Pulvirenti, A., Giudici, P. 2003. "*Candida humilis*— dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread", International Journal of Food Microbiology, 80, 55–59.

Hayford, A. E., Jespersen, L. 1999. "Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and MAL genotyping", Journal of Applied Microbiology, 86, 284–294.

Heard, G. M., Fleet, G. H. 1990. "A convenient microtitre tray procedure for yeast identification", Journal of Applied Bacteriology, 68, 447–451.

Heard, G.M. 1999. "Novel yeasts in winemaking – looking to the future", Food Australia, 51, 347–352.

Hernawan, T., Fleet, G.H. 1995. "Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts", Journal of Industrial Microbiology, 14, 440–450.

Hinton, A., Cason J.A., Ingram, K.D. 2002. "Enumeration and identification of yeasts associated with commercial poultry processing and spoilage of refrigerated broiler carcasses", Journal of Food Protection, 65, 993–998.

Ismail, S.A., Deák, T., El-Rahman, H.A., Yassien, M.A., Beuchat, L.R. 2000. "Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature", International Journal of Food Microbiology, 62, 113–121.

Jakobsen, M., Norvhus, J., 1996. Yeast and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products, International Dairy Journal, 6, 755-768.

Jespersen, L., Jakobsen, M. 1996. "Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection", International Journal of Food Microbiology, 33, 139–155.

Jespersen, L., Nielsen, D. S., Honholt, S., Jakobsen, M. 2005. "Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans", FEMS Yeast Research, 5, 441–453.

Kachatourians G.G. 2014. Foodspoilage flora in Biochemicaland modern identification techniques, Encyclopedia of Food Microbiology, Vol 1

- Kalia, A., & Gupta, R. P. 2006. Fruit microbiology. Handbook of fruits and fruit processing, 1-28.
- Kao, Y.-T., Liu, Y.-S., Shyu, Y.-T. 2007. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Res. Int.* 40, 71–79
- Kesmen, Z., Yarımçam, B., Aslan, H., Özbekar, E., Yetim, H. 2014. "Application of different molecular techniques for characterization of catalase-positive cocci isolated from sucuk", *Journal of Food Science*, 79,M222-M229,
- Kotzekidu, P. 1997. "Identification of yeasts from black olives in rapid ystem microtitre plates", *Food Microbiology*, 14, 609–616.
- Krcmery, V., Barnes, A.J. 2002. "Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance", *The Journal of Hospital Infection*, 50, 243–260.
- Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.) 1984. *The Yeast, a Taxonomic Study*, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kubista, M., Andrade M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K. 2006. "The real-time polymerase chain reaction", *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
- Kurtzman, C. P. 2015." Identification of food and beverage spoilage yeasts from DNA sequence analyses", *International journal of food microbiology*, 213, 71-78.
- Kurtzman, C. P. Fell, J.W., 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P., James, S.A. 2006. *Zygosaccharomyces* and related genera, pp. 289–305. *In: Food Spoilage Microorganisms*, Eds: C. de W. Blackburn, Woodhead Publishing, Cambridge
- Kuzpınar, A. 2007. High resolution melting curve (HRM) analiz yönteminin delesyon tipi mutasyonların saptanmasında kullanımı, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans, Ankara, 51s.
- Lages, F., Silva-Gracia M., Lucas, C. 1999. "Active glycerol uptake is a mechanism

underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species", *Microbiology*, 145, 2577–2585.

Land, G. A., McGinnis, M. R., Salkin, I. F., 1991. Evaluation of commercial kits and systems for the rapid identification and biotyping of yeasts, pp. 353–366. In: *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology* (Eds. A. Vaheri, R. C. Tilton, A. Balows). Springer Verlag, Berlin.

Legan, J.D., Voysey, P.A. 1991. "Yeast spoilage of bakery products and ingredients", *Journal of Applied Bacteriology*, **70**, 361–371.

Lin, C. C. S., Fung, D. Y. C. 1987. Comparative biochemical reactions and identification of food yeast by the conventional methods, Fung's minimethod, Minitex, and the Automicrobic System. *Critical Reviews in Biotechnology*, 7, 1–16.

López, V., Querol, A., Ramón, D., Fernández-Espinar, M. T. 2001. "A simplified procedure to analyse mtDNA from industrial yeasts", *International Journal of Food Microbiology*, 68, 75–81.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. 2003. "Spoilage yeasts in the wine industry", *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23– 50.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. 2006. *Dekkera/Brettanomyces* spp., pp. 354– 400. In *Food Spoilage Microorganisms*, Eds: C. de W. Blackburn, Woodhead Publishing, Cambridge.

Loureiro, V., Querol, A. 1999. "The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages", *Trends in Food Science & Technology*, 10, 356-365.

Ma, H., Shieh, K.J., Chen, G., Qiao, X., Chuang, M.Y. 2006. "Application of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)", *The Journal of American Science*, 2, 1–15.

Magan, N., Aldred, D. 2006. Managing microbial spoilage in cereal and baking products, pp. 195–212. In: *Food Spoilage Microorganisms*, (Eds: C. de W. Blackburn). Woodhead Publishing, Cambridge.

Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., Spencer-Martins, I. 1992. "Characterization of the yeast population in olive brines", *Letters in Applied*

Microbiology, 14, 279–283.

Martorell, P., Fernández-Espinar M.T., Querol A. 2005. "Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources", International Journal of Food Microbiology, 101, 293–302.

Martorell, P., Fernández-Espinar M.T., Querol A. 2005. "Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources", International Journal of Food Microbiology, 101, 293–302.

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M.T., Querol A. 2007. "Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments", International Journal of Food Microbiology, 114, 234–242

Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leao, C. 2002. "Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts", Journal of Food Protection, 65, 1033– 1037.

Mitrakul, C. M., Henick-Kling, T., Egli, C. M. 1999. "Discrimination of Brettanomyces/Dekkera yeasts isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods", Food Microbiology, 16, 3–14.

Montgomery, J., Wittwer, J.T., Palais, R., Zhou, R. 2007. "Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis", Nature Protocols, 2, 59-66.

Mustapha, A., P., Singh, 2014. Recent developments in molecular-based food-borne pathogen detection In: Microbial Food Safety and Preservation Techniques, Eds: V. Ravishankar Rai, Jamuna A. Bai, CRC Press, pp.143-157.

Papouskova, K., Sychrova, H. 2007. "The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyceshansenii* cells", International Journal of Food Microbiology, 118,1–7.

Paugham, A., Benchetrit, M., Fiarce, A., Tourte-Schaefer, C., Dupouy-Camet, J. 1999. "Comparison of four commercialized biochemical systems for clinical yeast identification by colour-producing reactions", Medical Mycology, 37, 11– 17.

Petersen, K. M., Møller, P. L., Jespersen, L. 2001. "DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses", International Journal of Food Microbiology, 69, 11–24.

Petersen, K. M., Westall, S., Jespersen, L. 2002. "Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses", Journal of Dairy Science, 85, 478-486.

Phister, T.G., Mills, D.A. 2003. "Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine", Applied and Environmental Microbiology, **69**, 7430–7434.

Phister, T.G., Rawsthorne, H., Joseph, C.M., Mills, D.A. 2007. "Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Hanseniaspora* species from wine and juice", American Journal of Enology and Viticulture, 58, 229–233.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1985. Fungi and Food Spoilage. Academic Press, Sydney, Australia 413 pp. B123

Power, E. G. M. 1996. "RAPD typing in microbiology—a technical review", Journal of Hospital Infection, 34, 247–265.

Quesada, M. P., Cenis, J. L. 1995. "Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR in the characterization of wine yeasts", American Journal of Enology and Viticulture, 46, 204–208.

Radler, F., 1993. Yeasts – metabolism of organic acids, pp. 165–182. In: Wine Microbiology and Biotechnology, Ed: G.H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland,

Reed, G. H., Kent, J. O., Wittwer, C. T. 2007. "High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics", Pharmacogenomics, 8, 597–608.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction,

Romano, A., Casaregola, S., Torre, P., Gaillardin, C. 1996. "Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii*

yeast strains isolated from cheese", *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 255–264.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso M., Capece, A. 2003. "Function of yeast species and strains in wine flavor", *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169–180.

Romano, P., Grazia, L., Suzzi, G., Giudici, P. 1989. "The yeasts in cheese-making", *Yeast* 5(Special Issue) pp. 151–155.

Roostita, R., Fleet, G.H. 1996. "Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition", *International Journal of Food Microbiology*, 31, 205–219.

Roostita, R., Fleet, G.H. 1999. "Growth of yeasts isolated from cheeses on organic acids in the presence of sodium chloride", *Food Technology and Biotechnology*, 37, 73–79.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Schaf, S. J., Higuchi, R., Hoprn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, 239, 487–491.

Sandhu, G. S., Kline, B. C., Stockman, L., Roberts, G. D. 1995. "Molecular probes for diagnosis of fungal infections", *Journal of clinical microbiology*, 33(11), 2913-2919.

Seiler, H., Busse, M., 1988. Identifizierung von Hefen mit Mikrotiterplatten. *Forum Mikrobiology*, 11, 505–509.

Silva, P., Cardoso, H., Geros, H. 2004. "Studies on the wine spoilage of *Brettanomyces/ Dekkera* spp.", *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 65–71.

Spiropoulos, A.J., Tanaka, J., Flerianos, I., Bisson, L. 2000. "Characterization of hydrogen sulfide in commercial and natural wine isolate of *Saccharomyces*", *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 233–248.

Stager, C. E., Davies, J. R. 1992. "Automated systems for identification of microorganisms", *Clinical Microbiology Reviews*, 5, 302–327.

Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N., Stratford, M. 1999. "*Zygosaccharomyceslentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low

temperature", *Journal of Applied Microbiology*, 87, 520–527.

Stratford, M., Hofman, P.D., Cole, M.B. 2000. Fruit juices, fruit drinks and soft drinks, pp. 836–869. *In: The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen (Eds: B.M. Lund, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould), Gaithersburg, MD, USA.

Strauss, M.C.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P. 2001. "Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts", *Journal of Applied Microbiology*, 91, 182–190.

Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M. T., Caruso, M., Andrighetto, C., Gardini, F. 2000. "Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo Mozzarella cheese", *Journal of Applied Microbiology*, 88, 117–123.

Sümer, H. 2008. *Nokta Mutasyonlarının Saptanmasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniğinin Verim ve Hassasiyetinin Değerlendirilmesi*. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans, Ankara, 71 s.

Sweigers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke P.A., Pretorius, I.S. 2005. "Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor", *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 139–173.

Thomas, D.S. 1993. Yeasts as Spoilage Organisms in Beverages, pp. 517-561 *In: The Yeasts*, Vol. 5, 2nd edition (Eds: Rose, A.H. and Harrison, J.S.), Academic Press.

Tokuoka, K. 1993. "Sugar and salt-tolerant yeasts", *Journal of Applied Microbiology*, 74, 101–110.

Tornai-Lehoczki, J., Dlačny, D. 2000. "Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques", *International Journal of Food Microbiology*, 62, 37–45.

Tudor, E., Board, R., 1993. Food spoilage yeasts, pp. 435–516. *In: Eds: A. Rose, J. Harrison, The Yeasts*, 2nd ed. Yeast Technology, vol. 5. Academic Press, London.

Valdés-Stauber, N., Scherer, S., Seiler, H. 1997. "Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses", *International Journal of Food Microbiology*, 34, 115–119.

Van Dijken, J. P., Van Den Bosch, J. J., Hermans, L., de Miranda, R., Scheffers, W. A. 1986. "Alcoholic fermentation by "non-fermentative" yeasts", *Yeast*, 2, 123– 127.

Van Eck, J.H., Prior B.A., Brandt, E.V. 1993. "The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts", *Journal of General Microbiology*, 139, 1047–1054.

Vasdinyei, R., Deák, T. 2003. "Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques", *International Journal of Food Microbiology*, 86, 123–130.

Verweij, P.E., Breuker, I. M., Rijs, A.J.M.M., Meis, J.F.G.M. 1999. "Comparative Study Of Seven Commercial Yeast Identification Systems", *Journal of Clinical Pathology*, 52, 271–273.

Vossen, R.H.A.M., Aten, E., Roos, A., Den Dunnen, J.T. 2009. High-resolution melting analysis (HRMA) – More than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 30, 860–866.

Walker, H.W. 1977. "Spoilage of food by yeasts", *Food Technology*, 65, 57–61.

White, H., Potts, G. 2006. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of RotorGene 6000 (Corbett Life Science), HR1 and 384 well LightScanner (Idaho Technology). (Rapor No: NGRLW_HRM_1.0). United Kingdom, National Genetics Reference Laboratory (Wessex).

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Eds: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. I. Sninsky, T. J. White). Academic Press, San Diego, CA.

Wojtatowicz, M., J., Chrzanowska, P., Juskekyk, A., Skib, A., Gdula. 2002. "Identification and biochemical characteristics of yeast mycoflora of Rokpol cheese", *International Journal of Food Microbiology*, 69, 135–140.

Yarrow, D. 1998. *Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts' in The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4th edition, Eds: C.P. Kurtzman, J.W. Fell, Elsevier

Yetiman A.E., Kesmen Z. 2015. "Identification Of Acetic Acid Bacteria In Traditionally Produced Vinegar And Mother Of Vinegar By Using Different Molecular Techniques" , International JournalL of Food Microbiology, 204, 9-16

Zhao, J., Fleet, G.H. 2005. "Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides", Journal ofIndustrial Microbiology and Biotechnology, 32, 415 423.